

# Informe de la reunión de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos de la OMSA

Original: Inglés (EN)

19 de enero y  
15 al 22 de febrero de 2023  
Formato híbrido

## Introducción y comentarios de los Miembros

Este informe presenta la labor de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos (en adelante, Comisión para los Animales Acuáticos) que se reunió el 19 de enero, en formato virtual y en París (Francia), del 15 al 22 de febrero de 2023.

La Comisión para los Animales Acuáticos agradece a los siguientes Miembros por el envío de sus comentarios sobre los proyectos de texto para el *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* de la OMSA (*Código Acuático*) y el *Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos* de la OMSA (*Manual Acuático*) que circularon en la reunión de la Comisión de septiembre de 2022: Alemania, Australia, Brasil, Canadá, Chile, China (República Popular de), Eslovenia, España, Estados Unidos de América, Irlanda, Japón, Noruega, Nueva Zelanda, Reino Unido, Suecia, Suiza, Tailandia, Taipéi Chino, los Miembros de la Región de las Américas de la OMSA y los Estados miembros de la Unión Europea (UE). Igualmente, expresa su agradecimiento a numerosos expertos de la red científica de la OMSA por su valiosa participación y contribución.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó todos los comentarios de los Miembros que se presentaron a tiempo y que estaban acompañados por fundamentos. Dada la gran carga de trabajo, no pudo preparar una explicación detallada de las razones que la motivaron a aceptar o rechazar los comentarios recibidos y centró sus explicaciones en las más importantes. Cuando se trata de cambios de naturaleza editorial, no se brinda ningún texto explicativo. La Comisión desea destacar que, en aras de claridad, no se aceptaron todos los textos propuestos por los Miembros; en dichos casos, consideró que el texto era claro tal y como estaba redactado. Las modificaciones se señalan del modo habitual con “subrayado doble” y “~~texto tachado~~” y figuran en los anexos del presente informe. En los anexos, los cambios propuestos en esta reunión se muestran con un **fondo de color** para distinguirlos de los realizados anteriormente.

## Anexos

Los textos en los **Anexos 4 a 12 y 22 a 33** se presentarán para adopción en la 90.ª Sesión General de mayo de 2023.

Los textos que figuran en los **Anexos 13 a 15, 17 a 21 y 34 a 38** se presentan para comentario de los Miembros.

## Cómo enviar los comentarios

La Comisión para los Animales Acuáticos anima encarecidamente a los Miembros y a las organizaciones que han suscrito un acuerdo de cooperación con la OMSA a participar en la elaboración de las normas internacionales de la Organización enviando sus comentarios sobre este informe. Todos los comentarios deben enviarse a la OMSA a través de sus Delegados o de organizaciones con las que la Organización tenga un acuerdo de cooperación.

La Comisión llama la atención de los Miembros sobre los temas específicos tratados por un grupo *ad hoc* a petición de la Comisión para los Animales Acuáticos. En tales casos, se insta a los Miembros a examinar estos informes junto con el informe de la Comisión. Se destaca que los informes de los grupos *ad hoc* ya no se adjuntan al informe de la Comisión. En su lugar, podrá consultarlos en las páginas del sitio web de la OMSA:

[Grupos ad hoc - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](https://www.woah.org)



---

Se recuerda que los comentarios deben remitirse en formato Word y no PDF, ya que este último formato es difícil de incorporar a los documentos de trabajo de la Comisión.

Los comentarios se deberán presentar en el anexo pertinente e incluir toda modificación de texto, en base a una justificación estructurada o a partir de referencias científicas publicadas. Las supresiones propuestas deberán indicarse con “texto tachado” y, las inserciones, con “subrayado doble”. Se ruega a los Miembros que no utilicen la función automática “Resaltar cambios” del procesador de texto, ya que dichos cambios se pierden en el proceso de recopilación de las propuestas de los Miembros incluidas en los documentos de trabajo de la Comisión.

### **Fecha límite para enviar los comentarios**

Todos los comentarios sobre los textos pertinentes de este informe deberán remitirse a la sede de la OMSA hasta el 3 de julio de 2023 para que la Comisión los examine en su reunión de septiembre de 2023.

### **Dónde enviar los comentarios**

Todos los comentarios deberán remitirse por correo electrónico al Departamento de Normas:  
[AAC.Secretariat@woah.org](mailto:AAC.Secretariat@woah.org).

### **Fecha de la próxima reunión**

La Comisión indicó que su próxima reunión se realizará del **13 al 20 de septiembre de 2023**.

---

## Índice

<b>1. Bienvenida</b> .....	<b>6</b>
1.1. Bienvenida de la directora general adjunta de la OMSA de Normas Internacionales y Ciencia ....	6
1.2. Directora general de la OMSA.....	6
1.3. Actualización de la sede de la OMSA .....	7
1.3.1. Informes de las comisiones especializadas de la OMSA .....	7
1.3.2. Seminarios previos a la Sesión General.....	7
1.3.3. Uso del acrónimo “OMSA” en el <i>Código Acuático</i> y el <i>Manual Acuático</i> .....	8
<b>2. Aprobación del orden del día</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Cooperación con la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Cooperación con la Comisión de Normas Biológicas</b> .....	<b>9</b>
4.1. Centros de referencia: debate sobre los modelos de informe anual y la utilización de los datos colectados.....	9
4.2. <i>Manuales Acuático y Terrestre</i> : áreas de interés común .....	9
4.2.1. Tabla de la Comisión para los Animales Acuáticos sobre los parámetros de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para consideración de la Comisión de Normas Biológicas.....	9
4.2.2. Actualización del capítulo sobre la validación de las pruebas de diagnóstico del <i>Manual Terrestre</i> .....	9
4.2.3. Nueva sección en los capítulos específicos de enfermedad para describir la justificación subyacente en la selección de pruebas para los distintos propósitos indicados en la Tabla 1. <i>Métodos analíticos disponibles y su propósito y una explicación de su puntuación</i> .....	10
4.2.4. Desarrollo de un modelo para los informes de validación para las pruebas en el <i>Manual Terrestre</i> .....	10
4.3. Trabajo sobre la lista de los reactivos de referencia aprobados por la OMSA .....	10
<b>5. Plan de trabajo y prioridades</b> .....	<b>11</b>
<b>6. Estrategia de la OMSA sobre la sanidad de los animales acuáticos (la Estrategia)</b> .....	<b>11</b>
<b>Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OMSA</b> .....	<b>12</b>
<b>7. Textos que se propondrán para adopción en mayo de 2023</b> .....	<b>12</b>
7.1. Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. <i>Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)</i> .....	12
7.2. Artículos 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. <i>Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)</i> .....	12
7.3. Artículo 9.5.2 del Capítulo 9.5. <i>Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa</i> .....	13
7.4. Artículo 10.9.2. del Capítulo 10.9. <i>Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa</i> .....	13
7.5. Nuevo Capítulo 10.X. <i>Infección por el virus de la tilapia del lago</i> .....	14
7.6. Artículo 11.2.2. del Capítulo 11.2. <i>Infección por Bonamia exitiosa</i> y Artículo 11.3.2. del Capítulo 11.3. <i>Infección por Bonamia ostreae</i> .....	16
7.7. Artículos 11.4.1. y 11.4.2. del Capítulo 11.4. <i>Infección por Marteilia refringens</i> .....	16
7.8. Modelo de Artículos 11.X.9. - 11.X.14. para los capítulos específicos de las enfermedades de los moluscos.....	17
<b>8. Ítems para comentario de los Miembros</b> .....	<b>18</b>

8.1.	Definiciones del Glosario: “servicios de sanidad de los animales acuáticos”, “autoridad veterinaria” y “autoridad competente”.....	18
8.2.	Artículo 1.1.5. del Capítulo 1.1. <i>Notificación de las enfermedades y aportación de datos epidemiológico</i> .....	19
8.3.	Artículo 1.3.1. del Capítulo 1.3. <i>Enfermedades de la lista de la OMSA – Inclusión en la lista de la infección por todos los genogrupos de las especies de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón</i> .....	20
8.4.	Mercancías seguras – Artículos X.X.3. para los capítulos específicos de enfermedad .....	23
8.4.1.	Artículos 8.X.3. para los capítulos específicos de las enfermedades de los anfibios .....	24
8.4.2.	Artículos 9.X.3. para los capítulos específicos de los crustáceos .....	24
8.4.3.	Artículos 10.X.3. para los capítulos específicos de los peces.....	25
8.4.4.	Artículos 11.X.3. para los capítulos específicos de los moluscos .....	25
8.5.	Artículos 11.5.1. y 11.5.2. del Capítulo 11.5. Infección por <i>Perkinsus marinus</i> .....	26
<b>9.</b>	<b>Ítems para información de los Miembros.....</b>	<b>26</b>
9.1.	Enfermedades emergentes .....	26
9.1.1.	Infección por el virus del edema de la carpa .....	27
9.1.2.	Infección por el nodavirus de la mortalidad encubierta (CMNV) .....	28
	<b>Manual de pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OMSA.....</b>	<b>28</b>
<b>10.</b>	<b>Textos que se propondrán para adopción en mayo de 2023 .....</b>	<b>31</b>
10.1.	Sección 2.2. <i>Enfermedad de los crustáceos</i> .....	31
10.1.1.	Capítulo 2.2.1. <i>Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda</i> .....	31
10.1.2.	Capítulo 2.2.3. <i>Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)</i> .....	33
10.1.3.	Capítulo 2.2.4. <i>Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)</i> .....	34
10.1.4.	Capítulo 2.2.5. <i>Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa</i> .....	36
10.1.5.	Capítulo 2.2.7. <i>Infección por el virus del síndrome de Taura</i> .....	37
10.1.6.	Capítulo 2.2.8. <i>Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas</i> .....	39
10.2.	Sección 2.3. <i>Enfermedades de los peces</i> .....	40
10.2.1.	Capítulo 2.3.1. <i>Infección por Aphanomyces invadans (síndrome epizoótico ulcerante)</i> ....	40
10.2.2.	Capítulo 2.3.2. <i>Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica</i> .....	41
10.2.3.	Sección 2.2.1. del Capítulo 2.3.9. <i>Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa</i> .....	43
10.3.	Sección 2.4. <i>Enfermedades de los moluscos</i> .....	44
10.3.1.	Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. <i>Infección por Bonamia exitiosa</i> y Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.3. <i>Infección por Bonamia ostreae</i> .....	44
10.3.2.	Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.4. <i>Infección por Marteilia refringens</i> .....	45
<b>11.</b>	<b>Ítems para comentario de los Miembros .....</b>	<b>45</b>
11.1.	Sección 2.2. <i>Enfermedades de los crustáceos</i> .....	45
11.1.1.	Capítulo 2.2.0. <i>Información general: enfermedades de los crustáceos</i> .....	45
11.1.2.	Capítulo 2.2.2. <i>Infección por Aphanomyces astaci (plaga del cangrejo del río)</i> .....	47

---

11.1.3. Capítulo 2.2.6. <i>Infección por el nodavirus Macrobrachium rosenbergii (enfermedad de la cola blanca)</i> .....	49
11.1.4. Capítulo 2.2.9. <i>Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1</i> .....	50
11.2. Sección 2.4. <i>Enfermedades de los moluscos</i> .....	51
11.2.1. Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.5. <i>Infección por Perkinsus marinus</i> .....	51
11.3. Desarrollo de un mecanismo para acelerar el proceso de presentación a los Miembros de las actualizaciones de los métodos de diagnóstico del <i>Manual Acuático</i> .....	51
<b>12. Grupos ad hoc</b> .....	<b>52</b>
12.1. Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA .....	52
12.2. Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA .....	52
12.3. Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA .....	52
<b>13. Centros de referencia de la OMSA o cambios de expertos</b> .....	<b>52</b>
13.1. Evaluación de las solicitudes para la designación como centro de referencia de la OMSA en temas de sanidad de los animales acuáticos o cambio de expertos .....	52
<b>14. Otros asuntos</b> .....	<b>53</b>
14.1. Registro de los kits de diagnóstico .....	53
14.1.1. Registro de los kits de diagnóstico de la OMSA.....	53
14.1.2. <i>Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit</i> .....	54
<b>Anexo 1. Ítem 2 – Orden del día aprobado</b> .....	<b>55</b>
<b>Anexo 2. Ítem 2 – Lista de participantes</b> .....	<b>59</b>

## Lista de anexos

<b>Anexo 1. Ítem 2 – Orden del día adoptado</b> .....	<b>56</b>
<b>Anexo 2. Ítem 2 – Lista de participantes</b> .....	<b>59</b>

---

## 1. Bienvenida

### 1.1. Bienvenida de la directora general adjunta de la OMSA de Normas Internacionales y Ciencia

La Dra. Montserrat Arroyo, directora general adjunta de Normas Internacionales y Ciencia, dio la bienvenida a los integrantes de la Comisión para los Animales Acuáticos y les agradeció su contribución a la labor de la OMSA. Asimismo, felicitó a la Comisión por su ambiciosa agenda y extendió su agradecimiento a las instituciones empleadoras y a los gobiernos nacionales.

La Dra. Arroyo informó a la Comisión de que el proceso de selección de los expertos propuestos para su elección a las comisiones especializadas de la OMSA se iniciaría con la convocatoria de expertos en julio de 2023 y que las elecciones tendrían lugar durante la 91.<sup>a</sup> Sesión General en mayo de 2024. A su debido tiempo, se facilitará la correspondiente información a los Delegados.

Igualmente se refirió a la celebración en presencial de la 90.<sup>a</sup> Sesión General. Señaló que este año el programa incluiría un "Foro de la Sanidad Animal" centrado en la influenza aviar y destinado a promover el debate entre los Delegados sobre este importante problema zoonosario mundial.

Al igual que en los años anteriores, destacó los seminarios web de las comisiones previos a la Sesión General que este año volverán a llevarse a cabo. El 20 de abril de 2023 a las 12:00-2:00 (CEST), el presidente de la Comisión, el Dr. Ingo Ernst, presentará para adopción los capítulos nuevos y revisados del *Código Acuático* y del *Manual Acuático*. El seminario web contará con interpretación simultánea al francés y al español, se grabará y estará disponible en el sitio web de la OMSA.

La Dra. Arroyo informó a la Comisión de que el nuevo acrónimo "OMSA" se incorporaría en las versiones de 2023 del *Código Acuático* y del *Manual Acuático*.

La Dra. Arroyo ofreció información actualizada sobre los progresos realizados y la próxima publicación de una licitación con vistas a implementar una nueva herramienta de navegación en línea para las normas de la OMSA, además de la labor de promoción de la transparencia de los comentarios.

La Dra. Arroyo felicitó a la Comisión por la actualización de las evaluaciones de las mercancías seguras y anticipó que los Miembros apreciarían esta orientación adicional. Informó a la Comisión de que la OMSA apoyaba el recurso a consultores para labores técnicas específicas y que esta práctica debía mantenerse en el futuro.

Igualmente, reconoció la mejora de la armonización entre las comisiones especializadas, demostrada por la reunión de las mesas de la Comisión de Animales Acuáticos y de la Comisión de Normas Biológicas, y una más amplia coordinación de los ítems armonizados del plan de trabajo con la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres (Comisión del Código).

Los integrantes de la Comisión para los Animales Acuáticos agradecieron a la Dra. Arroyo el excelente respaldo prestado por la secretaría de la OMSA.

### 1.2. Directora general de la OMSA

La directora general de la OMSA, la Dra. Monique Eloit, se reunió con la Comisión para los Animales Acuáticos el día 16 de febrero y agradeció a cada uno de los integrantes por su compromiso a la hora de alcanzar los objetivos de la Organización.

La Dra. Eloit destacó la pertinencia del informe recientemente publicado por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), "*Preparándose para los supermicrobios: fortalecimiento de las medidas ambientales relativas a la respuesta a la resistencia a los antimicrobianos mediante el enfoque 'Una sola salud'*", para el plan de trabajo de la Comisión y las actividades de la "Estrategia sobre la sanidad de los animales acuáticos" (la Estrategia), en relación con el uso prudente y responsable de los agentes antimicrobianos. Destacó que, en su calidad de integrante de la alianza Cuatripartita, la OMSA

---

debía asegurarse de que se investigue la manera de abordar las recomendaciones presentadas en este informe, cuando fuera necesario.

La Dra. Eloit presentó a la Comisión los avances de la revisión del sistema científico de la OMSA y la evaluación comparativa con otras organizaciones internacionales. Además, aseguró a la Comisión que la mantendría informada de los avances en el proceso.

Por otra parte, destacó el informe anual del Observatorio de la OMSA, recientemente publicado, e indicó que ayudaría a los Miembros a comprender la forma en que el programa del Observatorio informa sobre la implementación de las normas de la OMSA. El informe contiene recomendaciones tanto para la OMSA como para los Miembros, con el fin de respaldar la implementación de las normas. La Comisión reconoció la gran cantidad de información contenida en el informe y expresó su interés por el modo en que las conclusiones y recomendaciones servirían de base a las estrategias de la OMSA. La Comisión dio las gracias al Dr. Eloit por estas actualizaciones.

### **1.3. Actualización de la sede de la OMSA**

#### **1.3.1. Informes de las comisiones especializadas de la OMSA**

Las secretarías de las comisiones especializadas de la OMSA siempre buscan mejorar la eficiencia en la producción y publicación de los informes de las respectivas comisiones especializadas, al tiempo que se preocupan por garantizar su coherencia, cuando fuera necesario. Tras examinar las propuestas de la secretaría, la directora general adjunta de Normas Internacionales y Ciencia acordó los siguientes cambios en la publicación de los informes de las Comisiones a partir de febrero de 2023:

1. Todos los informes de las comisiones especializadas se volverán a presentar como un informe único. (Nota: La Comisión Científica siempre ha elaborado un solo informe);
2. Los informes no oficiales en inglés dejarán de publicarse;
3. Los informes de las comisiones especializadas se publicarán en el sitio web de los Delegados (en formato Word para la Comisión de Animales Acuáticos y la Comisión del Código y en formato PDF para la Comisión de Normas Biológicas y la Comisión Científica) y en el sitio web público (todos en formato PDF) por idioma (es decir, inglés, francés y español) una vez finalizados. Al ser el inglés el idioma de trabajo, es inevitable la diferencia en el tiempo de publicación de la versión inglesa y de las versiones francesa y española; sin embargo, la OMSA se preocupará por limitar al mínimo este plazo;
4. Los cuatro informes de las comisiones especializadas se publicarán en inglés al menos dos semanas antes de los seminarios web previos a la Sesión General.

#### **1.3.2. Seminarios previos a la Sesión General**

1. Al igual que en los años anteriores, los seminarios web de información previos a la Sesión General de la Comisión para los Animales Acuáticos, la Comisión de Normas Biológicas y la Comisión del Código (con el apoyo de la Comisión Científica), se llevarán a cabo en una sola franja horaria y se grabarán y cargarán en el sitio web de la Sesión General. Estos seminarios web comenzarán con un mensaje del presidente de cada Comisión y se centrarán en la presentación de información sobre las normas nuevas o revisadas propuestas para adopción en la Sesión General.

NOTA: Las fechas de 2023 son: Comisión de Normas Biológicas - 18 de abril de 2023; Comisión del Código - 19 de abril de 2023; Comisión para los Animales Acuáticos - 20 de abril de 2023. Todos los seminarios web se llevarán a cabo entre 12:00-2:00 pm CEST.

2. La OMSA ya no ofrecerá un mecanismo para que los Miembros envíen posiciones previas a la Sesión General, como fue el caso en 2021 y 2022, cuando las Sesiones Generales se celebraron en formato virtual o híbrido. No obstante, si los Miembros desean remitir

---

extraoficialmente posiciones previas a la Sesión General para ayudar a los presidentes de las comisiones especializadas a preparar sus informes de la Sesión General, pueden hacerlo enviando sus mensajes por correo electrónico a la secretaría correspondiente.

### **1.3.3. Uso del acrónimo “OMSA” en el *Código Acuático* y el *Manual Acuático***

#### Contexto

En la 89.<sup>a</sup> Sesión General, celebrada en mayo de 2022, la Asamblea Mundial de Delegados adoptó la Resolución No. 10, en la que se reconocía que el acrónimo “OIE” sería sustituido por “OMSA”, en el marco de un cambio de imagen corporativa de la Organización.

En las reuniones de septiembre de 2022 de las comisiones especializadas, la directora general adjunta de Normas Internacionales y Ciencia de la OMSA comunicó la introducción de “OMSA” en las normas de la Organización en reemplazo de “OIE”. Se informó a las Comisiones de que la secretaría correspondiente presentaría un análisis y una propuesta a la Comisión específica en sus reuniones de febrero de 2023.

Además, antes de la reunión de febrero de 2023, la Comisión del Código recibió comentarios de varios Miembros solicitando que se utilizara el acrónimo "OMSA" en lugar de "OIE".

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión del Código examinó un análisis preparado por la secretaría sobre el uso de "OIE" en la edición actual del *Código Terrestre* y debatió una propuesta de enfoque para sustituir “OIE” por “OMSA”. Se informó a la Comisión de que las secretarías de las comisiones especializadas habían trabajado colectivamente para garantizar que esta enmienda se llevara a cabo de manera coherente en todas las normas (es decir, *Código Terrestre*, *Manual Terrestre*, *Código Acuático* y *Manual Acuático*).

La Comisión convino en que "lista de la OMSA" y "enfermedades de la lista" (término definido en el Glosario) debían sustituir a "lista de la OIE" y "enfermedades de la lista de la OIE", respectivamente, en todo el *Código Acuático* y el *Manual Acuático*. Asimismo, convino en que se modificara el título del Capítulo 1.3. del *Código Acuático* y que pasara a ser "Enfermedades de la lista de la OMSA".

La Comisión observó que los términos "Asamblea Mundial de Delegados de la OIE" y "Asamblea Mundial de Delegados" se utilizaban en el *Código Acuático*. En aras de coherencia, se convino en utilizar únicamente "Asamblea Mundial de Delegados".

La Comisión tomó nota de que el término “Estatutos Orgánicos de la OIE” se mencionaba en la Guía del usuario y en el Capítulo 1.1. del *Código Acuático*. Se acordó sustituir esta expresión por "Estatutos Orgánicos de la Oficina Internacional de Epizootias", que es el título oficial del documento jurídico.

La Comisión acordó que, en todos los demás casos, tanto en el *Código Acuático* como en el *Manual Acuático*, "la OIE" se sustituyera por "OMSA" (o "la OMSA" siguiendo las directrices internas de cambio de nombre de la Organización).

La Comisión convino en que estas enmiendas eran de naturaleza editorial y no afectaban la interpretación de las normas del *Código Acuático* o del *Manual Acuático*.

La Comisión aceptó la propuesta de la directora general adjunta de que estas modificaciones se aplicaran en la edición de 2023 del *Código Acuático* y del *Manual Acuático*.

La Comisión señaló que estos cambios, según los casos, se habían introducido en todos los anexos distribuidos en el presente informe bajo la forma de cambios silenciosos, es decir, sin tachadura/doble subrayado, por tratarse de cambios editoriales.

---

## 2. Aprobación del orden del día

El proyecto de orden del día fue aprobado por la Comisión. El orden del día y la lista de participantes figuran en el [Anexo 1](#) y el [Anexo 2](#), respectivamente.

## 3. Cooperación con la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres

La secretaria de la Comisión del Código informó a la Comisión para los Animales Acuáticos de los progresos realizados en los temas considerados de interés en una reunión de las mesas de la Comisión del Código y de la Comisión para los Animales Acuáticos celebrada en septiembre de 2022.

Se comunicó a la Comisión para los Animales Acuáticos que la Comisión del Código había revisado la utilización de los términos "servicios veterinarios", "autoridad competente" y "autoridad veterinaria" en el *Código Terrestre* y los había distribuido para comentario de los Miembros en su informe de febrero de 2023.

La Comisión para los Animales Acuáticos recibió información actualizada sobre el trabajo de la Comisión del Código en la revisión de los Capítulos 5.4. a 5.7. y del Capítulo 6.10. y solicitó una actualización en las futuras reuniones de la Comisión dada la importancia de garantizar la armonización, según proceda, de los capítulos correspondientes del *Código Acuático*.

## 4. Cooperación con la Comisión de Normas Biológicas

Las mesas de la Comisión de Normas Biológicas y de la Comisión para los Animales Acuáticos se reunieron el 8 de febrero de 2023 para debatir las siguientes áreas de interés común.

### 4.1. Centros de referencia: debate sobre los modelos de informe anual y la utilización de los datos colectados

En la reunión, ambas mesas debatieron el modelo actualizado del informe anual utilizado por los centros de referencia, con el objetivo de mejorar las preguntas formuladas para recibir respuestas más claras y mejorar la calidad de los datos reunidos. Coincidieron en que, pese a que se observan progresos en el modelo actualizado, podría mejorarse aún más si se indican los resultados que podrían derivarse de los datos, señalando que tales mejoras también aportarían beneficios a los centros de referencia responsables de completar los informes. Las mesas acordaron que, antes de la reunión de septiembre de 2023, la Comisión de Normas Biológicas enviaría un cuestionario a todos los laboratorios de referencia con preguntas sobre la utilidad del informe anual.

### 4.2. *Manuales Acuático y Terrestre*: áreas de interés común

#### 4.2.1. Tabla de la Comisión para los Animales Acuáticos sobre los parámetros de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para consideración de la Comisión de Normas Biológicas

Se comunicó a la mesa de la Comisión de Normas Biológicas que la Comisión para los Animales Acuáticos había elaborado una tabla sobre las secuencias de cebadores y sondas PCR y los parámetros de ciclado para que la información crítica sobre los métodos PCR se presentara de manera uniforme en todos los capítulos del *Manual Acuático*. La mesa de la Comisión de Normas Biológicas destacó la utilidad de presentar los parámetros PCR en formato tabular y acordó adoptar la misma metodología en los capítulos del *Manual Terrestre*.

#### 4.2.2. Actualización del capítulo sobre la validación de las pruebas de diagnóstico del *Manual Terrestre*

La mesa de la Comisión de Normas Biológicas informó a la Comisión para los Animales Acuáticos de que el Capítulo 1.1.6. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas* del *Manual Terrestre* se había revisado a fondo y que se propondría para adopción en la Sesión General de mayo de 2023. La Comisión para los Animales Acuáticos

---

observó que el *Manual Acuático* incluye un capítulo similar y que la revisión de este capítulo en el *Manual Terrestre* podía tener implicaciones para el Capítulo 1.1.2. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosas* del *Manual Acuático*. En la revisión del Capítulo 1.1.2. que la Comisión añadió a su futuro plan de trabajo, se tendrá en cuenta el capítulo revisado del *Manual Terrestre* y se transmitirá a la Comisión Biológica todo comentario pertinente sobre el Capítulo 1.1.6. del *Manual Terrestre*.

#### **4.2.3. Nueva sección en los capítulos específicos de enfermedad para describir la justificación subyacente en la selección de pruebas para los distintos propósitos indicados en la Tabla 1. *Métodos analíticos disponibles y su propósito y una explicación de su puntuación***

La mesa de la Comisión de Normas Biológicas informó a la de la Comisión para los Animales Acuáticos de que estaba trabajando para añadir una nueva sección a los capítulos específicos de enfermedad del *Manual Terrestre* que describa la justificación de la selección de pruebas para diferentes fines que figuran en la Tabla 1. *Métodos analíticos disponibles y su propósito y una explicación de su puntuación*. De este modo, se responderá a las preguntas de los Miembros y se justificarán las diferentes pruebas. El trabajo se encuentra en una fase piloto y es necesario finalizar el formato para dar flexibilidad a los expertos que proporcionen la justificación.

La mesa de la Comisión para los Animales Acuáticos señaló que ambas Comisiones buscaban lograr resultados similares al proporcionar información adicional sobre la idoneidad de determinadas pruebas. Observó que su enfoque es diferente en la Tabla 4.1. *Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados* del *Manual Acuático*. En ella se incluyen las etapas de vida, el nivel de validación y la clasificación con respecto a la finalidad del uso.

La mesa de la Comisión de Normas Biológicas acordó considerar este enfoque como parte de su labor.

#### **4.2.4. Desarrollo de un modelo para los informes de validación para las pruebas en el *Manual Terrestre***

La mesa de la Comisión de Normas Biológicas informó a la Comisión para los Animales Acuáticos de que había elaborado un modelo para los datos de validación de las pruebas recomendadas en el *Manual Terrestre*. Se invitará a los laboratorios de referencia a completar el formulario del "informe de validación", que se pondrá a disposición en el sitio web para la búsqueda de los datos de validación disponibles para la prueba. Como primer paso de un plan piloto encaminado a comprobar la idoneidad y utilidad del modelo, se difundió el documento a algunos laboratorios de referencia de la OMSA seleccionados para que lo completen y envíen sus comentarios.

La mesa de la Comisión para los Animales Acuáticos comunicó que había recibido comentarios de laboratorios de referencia sobre el tiempo que se tarda en incluir métodos nuevos o modificados en el *Manual Acuático*, ya que los métodos o la información de validación deben publicarse en artículos revisados por pares. La mesa de la Comisión para los Animales Acuáticos consideró que el modelo desarrollado por la Comisión de Normas Biológicas era útil a efectos de acelerar la inclusión de pruebas nuevas o modificadas en algunos casos y aceptó revisarlo y dar su opinión.

### **4.3. Trabajo sobre la lista de los reactivos de referencia aprobados por la OMSA**

La Comisión de Normas Biológicas publicó una lista de reactivos estándar internacionales aprobados por la OMSA y está planeando ampliar esta lista ([Productos veterinarios - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](https://www.woah.org/)).

Ambas Comisiones consideraron muy útil esta reunión a la hora de identificar y debatir ámbitos de armonización.

---

## 5. Plan de trabajo y prioridades

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Noruega, Reino Unido, Miembros de la Región Américas de la OMSA y la UE.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó los comentarios recibidos y tomó nota del apoyo al desarrollo de los nuevos capítulos del plan de trabajo. La Comisión examinó los progresos realizados hasta la fecha en cada uno de los cuatro nuevos proyectos de capítulo (Capítulo 4.X. *Preparación de emergencia frente a las enfermedades*, Capítulo 4.Y. *Gestión de los brotes de enfermedades*, Capítulo 5.X. *Animales acuáticos ornamentales* y Capítulo 5.Y. *Comercio de materiales genéticos*) y acordó seguir trabajando en los cuatro capítulos con la intención de presentarlos para comentario de los Miembros en su informe de septiembre de 2023.

La Comisión se mostró de acuerdo con un comentario que subrayaba que, con respecto al trabajo de revisión de los Capítulos 5.4. a 5.7. del *Código Terrestre*, debía adoptarse un enfoque armonizado con el de la Comisión del Código y explicó que este trabajo se trataría junto con la Comisión del Código.

La Comisión aceptó un comentario que destacaba la necesidad de armonizar la revisión del uso de las definiciones del glosario "servicios de sanidad de los animales acuáticos", "autoridad competente", "autoridad veterinaria" y "servicios veterinarios" con la Comisión del Código y subrayó la armonización en los cambios propuestos en el *Código Acuático* y el *Código Terrestre* que se presentarán para comentario de los Miembros en los informes de febrero de 2023 de ambas comisiones (ver ítem 8.1.).

La Comisión estudió las respuestas al cuestionario para la revisión del Capítulo 4.3. *Aplicación de la compartimentación* y agradeció a los Miembros sus ideas y experiencias en la aplicación de las normas sobre compartimentación. La Comisión examinó los progresos realizados hasta la fecha en relación con el documento de debate sobre la compartimentación y acordó seguir avanzando en el trabajo sobre este documento con la intención de presentarlo para comentario en su informe de la reunión de septiembre de 2023.

La Comisión convino en examinar y revisar el Capítulo 3.1. *Calidad de los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos*, para armonizarlo con el capítulo correspondiente del *Código Terrestre*, revisado y adoptado en 2022. La Comisión decidió que el examen y la revisión del Capítulo 3.2. *Comunicación* también debían añadirse al plan de trabajo, señalando su falta de claridad y la necesidad de actualización. Estas cuestiones deberán tenerse en cuenta en el plan de trabajo de la próxima Comisión, que comenzará en junio de 2024.

La Comisión revisó la situación de los ítems en curso de su plan de trabajo y acordó los plazos para su finalización. La Comisión examinó el orden de prioridad de los nuevos temas de trabajo, teniendo en cuenta una serie de criterios, entre ellos la mejora esperada de las normas y su impacto, el beneficio para los Miembros, los comentarios de los Miembros, la pertinencia para las actividades de la Estrategia sobre la sanidad de los animales acuáticos de la OMSA, los comentarios de la sede de la OMSA y el avance de los temas del plan de trabajo en curso.

En 2023, la Comisión destacó que la progresión de los puntos del plan de trabajo que dependían de la convocatoria de grupos *ad hoc* avanzaría según lo acordado. La lista de grupos *ad hoc* actuales y previstos para 2023 se puede consultar en el sitio web de la Organización.

El plan de trabajo actualizado figura en el [Anexo 3](#) para comentario de los Miembros.

## 6. Estrategia de la OMSA sobre la sanidad de los animales acuáticos (la Estrategia)

La coordinadora de la Estrategia presentó un informe actualizado sobre su implementación. Se informó a la Comisión de los principales hitos y logros de los últimos doce meses, del estado actual de las actividades y de las prioridades clave para 2023. La Estrategia se puso en marcha en 2021 y ya se está trabajando en 16 de las 23 actividades previstas. Se elaborará un plan de trabajo anual para 2023, con el fin de determinar las prioridades y las necesidades de recursos, definir los plazos y evaluar los posibles obstáculos para su correcta

---

implementación. De este modo se garantizará que la Estrategia siga siendo pertinente y que se cumplan sus prioridades. Entre los logros del año anterior, cabe citar la asignación de recursos específicos a la Estrategia y los avances en las actividades relacionadas con sus cuatro objetivos.

## **Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OMSA**

### **7. Textos que se propondrán para adopción en mayo de 2023**

#### **7.1. Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)***

Se recibieron comentarios del Reino Unido y la UE.

##### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos aceptó modificar el Artículo 9.3.1. en aras de coherencia con el nombre utilizado en el Artículo 1.3.3. del Capítulo 1.3. *Enfermedades de la lista de la OMSA*.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión acordó modificar de nuevo el Artículo 9.3.1. para reflejar la clasificación taxonómica correcta.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 2.1.2., página 6) e informe de septiembre de 2022 (ítem 5.2., página 7).

##### Reunión de febrero de 2023

La Comisión examinó los comentarios recibidos y no propuso ninguna modificación adicional, señalando que los Miembros apoyaban los cambios propuestos.

El Artículo revisado 9.3.1. del Capítulo 9.3. *Infección por Hepatobacter penaei (Hepatopancreatitis necrotizante)* figura en el [Anexo 4](#) y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

#### **7.2. Artículos 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)***

Se recibieron comentarios de Canadá, Reino Unido, Taipéi Chino, y la UE.

##### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos aceptó modificar el Artículo 9.4.1. del Capítulo 9.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa* para reflejar una actualización en la clasificación taxonómica y en aras de coherencia con otros capítulos específicos de enfermedad.

En el Artículo 9.4.2., la Comisión aceptó enmendar las especies de crustáceos susceptibles de acuerdo con la convención utilizada en el Artículo X.X.2. del *Código Acuático*, es decir, enumerar las especies susceptibles por orden alfabético según el nombre común.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión revisó los comentarios recibidos y no propuso ninguna modificación adicional a los Artículos 9.4.1. y 9.4.2., señalando que los Miembros apoyaban los cambios propuestos.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

---

Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 2.1.3., página 6) e informe de septiembre de 2022 (ítem 5.3., página 8).

#### Reunión de febrero de 2023

No se recibió ningún comentario sobre el Artículo revisado 9.4.1.

A tenor de un comentario, la Comisión aceptó modificar la lista de especies susceptible del Artículo 9.4.2. de acuerdo con el convenio para enumerar las especies susceptibles por orden alfabético según el nombre común.

Los Artículos revisados 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. *Infección por el virus el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa* figuran en el **Anexo 5** y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

### **7.3. Artículo 9.5.2 del Capítulo 9.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa***

Se recibieron comentarios del Reino Unido y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos convino en modificar el Artículo 9.5.2. del Capítulo 9.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa* para enumerar las especies susceptibles por orden alfabético según el nombre común, para alinearse con la convención acordada que se utilizará para los Artículos X.X.2. del *Código Acuático*.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 5.4., página 8).

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión examinó los comentarios recibidos y no propuso ninguna modificación adicional, señalando que los Miembros apoyaban los cambios propuestos.

El Artículo revisado 9.5.2 del Capítulo 9.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa* figura en el **Anexo 6** y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

### **7.4. Artículo 10.9.2. del Capítulo 10.9. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa***

Se recibieron comentarios de Canadá, China (Rep. Pop. de), Nueva Zelanda, Reino Unido, Taipéi Chino, y la UE.

#### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos acordó que, a medida que se presentaran nuevas pruebas científicas sobre la susceptibilidad de las especies de animales acuáticos a las enfermedades de la lista de la OMSA, sería necesario efectuar evaluaciones de nuevas especies susceptibles o reevaluar las existentes. La Comisión añadió un nuevo ítem en su plan de trabajo para tratar esta necesidad. La Comisión instó a los Miembros a aportar toda nueva prueba científica sobre la susceptibilidad.

En respuesta a un comentario de un Miembro que aportó nuevas pruebas sobre la susceptibilidad y en preparación de su reunión de septiembre de 2022, la Comisión solicitó que el Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a las enfermedades de la lista de la OMSA evaluase la susceptibilidad de la carpa Jinsha bass (*Percocypris pingi*) a la infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa. El grupo *ad hoc* aplicó los criterios del Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de*

---

*especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico*, para la susceptibilidad de la carpa Jinsha bass (*Percocypris pingi*) a la infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión revisó la evaluación realizada por el grupo *ad hoc* y acordó incluir la carpa Jinsha bass (*Percocypris pingi*) en la lista de especies sensibles del Artículo 10.9.2. del Capítulo 10.9. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa*.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 5.5., página 8).

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión aceptó el comentario de que el nombre común en inglés de *Percocypris pingi* debía ser "*Jingsha barbel carp*" en lugar de "*Jingsha bass carp*", ya que la taxonomía de la especie la denomina "*barbel carp*" en inglés y revisó el nombre común de *Percocypris pingi* en el Artículo 10.9.2.

La Comisión observó que, en el Artículo 10.9.2., los nombres comunes de las especies susceptibles no seguían la convención empleada en el *Código Acuático* de utilizar únicamente la mayúscula para los nombres propios. La Comisión convino en modificar este artículo, así como otros casos en la versión 2023 del *Código Acuático*.

El Artículo revisado 10.9.2. del Capítulo 10.9. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa* figura en el [Anexo 7](#) y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

### **7.5. Nuevo Capítulo 10.X. *Infección por el virus de la tilapia del lago***

Se recibieron comentarios de China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión revisó el nuevo proyecto de Capítulo 10.X. *Infección por el virus de la tilapia del lago* (TiLV), y acordó indicar las especies susceptibles en el Artículo 10.X.2. "en estudio", a la espera de evaluaciones con respecto al Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico*. La Comisión también acordó indicar "en estudio", los productos de animales acuáticos enumerados en los apartados 1-2. del Artículo 10.X.3. y en el apartado 1a) del Artículo 10.X.14., a la espera de evaluaciones con arreglo al Capítulo 5.4. *Criterios para la evaluación de la inocuidad de las mercancías de animales acuáticos*. La Comisión convino en que los periodos por defecto para las condiciones elementales de bioseguridad y la vigilancia específica presentadas en el Capítulo 1.4. *Vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos* se aplicarán a la infección por TiLV hasta que se completara una evaluación de los periodos por defecto.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 5.6., página 9).

#### Reunión de febrero de 2023

#### **Artículo 10.X.3.**

La Comisión acordó modificar el tratamiento recomendado de tiempo/temperatura requerido para la inactivación de la infección por TiLV y suprimir "(en estudio)" al final del apartado 2, para ajustarse a las evaluaciones de mercancías seguras recientemente actualizadas (ver ítem 8.4.).

#### **Artículo 10.X.5.**

---

En la primera frase, la Comisión no aceptó cambiar "dentro de" por "entre", ya que "países" y "zonas" figuran en plural dentro de la frase.

La Comisión estudió un pedido de aclarar mejor la elección de los seis meses como periodo por defecto para las condiciones elementales de bioseguridad, en el apartado 1 del Artículo 10.X.5. y del Artículo 10.X.6. La Comisión observó que los periodos por defecto para las condiciones elementales de bioseguridad y la vigilancia específica presentados en el Capítulo 1.4. se aplicaban a todas las enfermedades de la lista de la OMSA, incluida la infección por TiLV. Los periodos por defecto se aplicarán hasta que se complete una evaluación de los periodos para las condiciones elementales de bioseguridad y la vigilancia específica con respecto a los criterios del Capítulo 1.4. para cada enfermedad de la lista de la OMSA. La Comisión señaló que había solicitado el asesoramiento de expertos para llevar a cabo estas evaluaciones y que, una vez revisadas por la Comisión, se propondrían cambios en los capítulos específicos de enfermedad.

En el apartado 3, la Comisión reconoció una posible ambigüedad de la redacción y añadió "e implementado" después de "se han reunido ininterrumpidamente" en aras de claridad. Asimismo, la Comisión agregó esta expresión al apartado 3 del Artículo 10.X.6. y al apartado 1 del Artículo 10.X.7. en aras de coherencia en todo el capítulo. La Comisión observó que, dado que estos artículos están armonizados en todos los capítulos específicos de enfermedad, estos cambios, una vez adoptados, se aplicarían al conjunto de dichos capítulos.

En el apartado 4b), la Comisión no acordó añadir "establecimientos de acuicultura" después de "poblaciones infectadas", por ser necesaria la erradicación de todas las poblaciones infectadas para recuperar la ausencia de enfermedad a nivel de país.

En el último párrafo del apartado 4, la Comisión modificó la redacción en aras de claridad y con la intención de garantizar la referencia adecuada para las acciones previas a la declaración de una nueva zona libre de enfermedad situada fuera de las zonas infectadas y de protección. Igualmente, agregó un nuevo párrafo final con la misma redacción que el apartado 4 del Artículo 10.X.5. en aras de coherencia entre "país" y "zona libre". La Comisión observó que, dado que estos artículos están armonizados en todos los capítulos específicos de enfermedad, estos cambios, una vez adoptados, se aplicarían al conjunto de dichos capítulos.

#### **Artículo 10.X.7**

En el apartado 2 c), la Comisión convino en que el periodo por defecto para la vigilancia específica necesaria para recuperar el compartimento libre de enfermedad debía ajustarse mejor al Artículo 1.4.14. del Capítulo 1.4. *Vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos*. La Comisión revisó la redacción y señaló que, dado que estos artículos estaban armonizados en todos los capítulos específicos de enfermedad, estos cambios, una vez adoptados, se aplicarían al conjunto de dichos capítulos.

#### **Artículo 10.X.11. y Artículo 10.X.14.**

La Comisión no estuvo de acuerdo en añadir "Si los animales acuáticos o los productos de animales acuáticos se destinan únicamente al consumo humano, no se requerirán pruebas o vigilancia adicionales, ya que el agente patógeno no es zoonótico" después de la última frase del Artículo 10.X.11. y después de la última frase del apartado 1 del Artículo 10.X.14., ya que la intención del artículo es indicar la necesidad de considerar controles de las vías de introducción para prevenir la entrada de enfermedades a través del uso no intencionado de un producto derivado de los animales acuáticos dentro de un país. La Comisión observó también que el Artículo 10.X.11. se refiere a la seguridad sanitaria y no a la inocuidad de los alimentos.

En respuesta a un comentario, la Comisión reconoció la dificultad de encontrar recursos sobre desinfectantes para todas las enfermedades de la lista, pero observó que el *Código Acuático* no era el lugar apropiado para ofrecer tales orientaciones. Remitió a los Miembros a otros recursos sobre desinfección y sugirió se consultará el Manual de descontaminación AQUAVETPLAN del Departamento Australiano de Agricultura, Pesca y Silvicultura como punto de partida.

---

El nuevo Capítulo revisado 10.X. *Infección por el virus de la tilapia del lago* figura en el **Anexo 8** y se presentará para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

#### **7.6. Artículo 11.2.2. del Capítulo 11.2. *Infección por Bonamia exitiosa* y Artículo 11.3.2. del Capítulo 11.3. *Infección por Bonamia ostreae***

Se recibieron comentarios del Reino Unido y la UE.

##### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos examinó el informe del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA y tomó nota de que el grupo *ad hoc* había recomendado una nueva nomenclatura para algunas especies de *Crassostrea*.

La Comisión acordó indicar directamente el nombre científico de la ostra de Suminoe "*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis*" y el del ostión japonés por "*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *gigas*" siempre que se utilicen en el *Código Acuático* y en el *Manual Acuático*.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Artículo 11.2.2. del Capítulo 11.2. *Infección por Bonamia exitiosa* – Informe de septiembre de 2022 (Ítem 5.7., página 9).

Artículo 11.3.2. del Capítulo 11.3. *Infección por Bonamia ostreae* – Informe de septiembre de 2022 (Ítem 5.7., página 9).

##### Reunión de febrero de 2023

La Comisión tomó nota de que el nombre común en FAOTERM de *Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis* se había cambiado recientemente en inglés por "*ariake cupped oyster*" y acordó modificar el Artículo 11.2.2. del Capítulo 11.2., *Infección por Bonamia exitiosa*, y el Artículo 11.3.2. del Capítulo 11.3. *Infección por Bonamia ostreae* para reflejar este cambio. La Comisión recordó a los Miembros que la fuente acordada para los nombres comunes de las especies susceptibles que figuran en la lista es FAOTERM.

La Comisión también acordó enmendar los Artículos 11.2.2. y 11.3.2. para enumerar las especies susceptibles por orden alfabético según el nombre común, para alinearse con la convención acordada que se utilizará para el Artículo X.X.2. del *Código Acuático*.

El Artículo revisado 11.2.2. del Capítulo 11.2. *Infección por Bonamia exitiosa* y el Artículo revisado 11.3.2. del Capítulo 11.3. *Infección por Bonamia ostreae* figuran en el **Anexo 9** y el **Anexo 10**, respectivamente, y se propondrán para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General en mayo de 2023.

#### **7.7. Artículos 11.4.1. y 11.4.2. del Capítulo 11.4. *Infección por Marteilia refringens***

Se recibieron comentarios de los Estados Unidos de América, el Reino Unido y la UE.

##### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos analizó el informe del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA para continuar su labor sobre la aplicación de los criterios del Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de especies susceptibles a la infección por un patógeno específico*.

La Comisión acordó modificar la lista de especies susceptibles del Artículo 11.4.2. de acuerdo con las recomendaciones del grupo *ad hoc*, excepto para el copépodo (*Paracartia grani*). La Comisión observó

---

que, aunque el copépodo (*Paracartia grani*) cumple los criterios para figurar en la lista como susceptible a la infección por *M. refringens*, acordó no incluirlo en el Artículo 11.4.2. del Capítulo 11.4. *Infección por* *Marteilia refringens*, del *Código Acuático* al considerar que esta especie no era pertinente para el comercio de moluscos o productos derivados. Sin embargo, convino en que el copépodo (*Paracartia grani*) debía incluirse en la Sección 2.2.1. del Capítulo 2.4.4. *Infección por* *Marteilia refringens* en el *Manual Acuático*.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 4.1., página 17) e informe de septiembre de 2022 (Ítem 5.8., página 10).

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión examinó un comentario que solicitaba que el ámbito de aplicación del capítulo incluyese claramente los tipos O y M de *Marteilia refringens*. La Comisión indicó que el capítulo se aplicaba a ambos tipos y convino en añadir "(incluidos los tipos O y M)" después de "el agente patógeno *M. refringens*" en el Artículo 11.4.1. en aras de coherencia con la Sección 1 del Capítulo 2.4.4. *Infección por* *Marteilia refringens* en el *Manual Acuático*.

En el Artículo 11.4.2., la Comisión aceptó un comentario y, en la versión inglesa, corrigió el nombre común de *Chamelea gallina* por "*striped venus clam*" (chirla).

Los Artículos revisados 11.4.1. y 11.4.2. del Capítulo 11.4. *Infección por* *Marteilia refringens* figuran en el **Anexo 11** y se presentarán para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo 2023.

### **7.8. Modelo de Artículos 11.X.9. - 11.X.14. para los capítulos específicos de las enfermedades de los moluscos**

Se recibieron comentarios de Canadá, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos observó que algunas modificaciones introducidas previamente en las Secciones 8, 9 y 10 del *Código Acuático* (enfermedades de los anfibios, crustáceos y peces) no se habían aplicado sistemáticamente a los artículos pertinentes de los capítulos de la Sección 11 (enfermedades de los moluscos). Por consiguiente, acordó modificar los Artículos 11.X.9. a 11.X.14. con los cambios horizontales aplicados anteriormente a otros capítulos específicos de enfermedad. La Comisión convino en que las modificaciones señaladas en el modelo de Artículos 11.X.9. a 11.X.14. se aplicarían a todos los capítulos específicos de enfermedad de la Sección 11. una vez adoptadas las modificaciones propuestas para los Artículos 11.X.9. a 11.X.14.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2018 (ítem 1.11., página 13) e informe de septiembre de 2022 (ítem 5.9., página 11).

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión tomó nota de algunos cambios adicionales requeridos en estos artículos modelo a efectos de garantizar la armonización entre todos los capítulos específicos de enfermedad. Una vez las modificaciones adoptadas, se revisará el conjunto de dichos capítulos para garantizar una redacción armonizada en todo el *Código Acuático*.

#### **Artículo 11.X.10.**

---

En el apartado 1b) del Artículo 11.X.10., la Comisión no acordó añadir "y eliminan de forma biosegura de conformidad con el Capítulo 4.8. o" después de "se sacrifican", ya que este requisito de eliminación biosegura se trataba en el apartado 1c).

La Comisión no aceptó añadir "receptora" después de "origine" en el apartado 1b), por no considerarse una mejora.

#### **Artículo 11.X.11.**

En los apartados 2 o 3 del Artículo 11.X.11. y en el apartado 2 del Artículo 11.X.12., la Comisión denegó añadir una referencia cruzada al Capítulo 4.1., ya que estos apartados se refieren específicamente a la inactivación de agentes patógenos y a la eliminación biosegura, y no a la bioseguridad en general. Se consideró que el Capítulo 4.1. *Bioseguridad en los establecimientos de acuicultura* era demasiado amplio para incluirlo como referencia cruzada en estos apartados.

En respuesta a un comentario sobre el apartado 2 del Artículo 11.X.11., instó a los Miembros a consultar otros recursos sobre desinfección (ver ítem 7.5.).

Al igual que en el Capítulo 10.X. *Infección por TiLV*, la Comisión no estuvo de acuerdo en añadir "Si los animales acuáticos o los productos de animales acuáticos se destinan únicamente al consumo humano, no deberían exigirse pruebas o vigilancia adicionales, ya que el agente patógeno no es zoonótico" al finalizar la última frase del Artículo 11.X.11., después de la última frase del apartado 1 y de la última frase del apartado 2 del Artículo 11.X.14. (ver ítem 7.5.).

#### **Artículo 11.X.13.**

En el Artículo 11.X.13., en respuesta a un comentario sobre la inclusión de orientaciones para los productos de animales acuáticos importados para su uso en laboratorios, con fines de alimentación para los animales de zoológico, o recurso a tejidos o células para investigación, la Comisión acordó que no se necesitaban enmiendas adicionales, ya que este aspecto se trataba en el Artículo 11.X.12.

La Comisión recordó a los Miembros que, una vez adoptados, los modelos de Artículos 11.X.9. a 11.X.14. se aplicarán a todos los capítulos específicos de enfermedad en la Sección 11.

Los modelos de Artículos 11.X.9. a 11.X.14. figuran en el [Anexo 12](#) y se presentarán para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

### **8. Ítems para comentario de los Miembros**

#### **8.1. Definiciones del Glosario: “servicios de sanidad de los animales acuáticos”, “autoridad veterinaria” y “autoridad competente”**

##### Contexto

En la 89.<sup>a</sup> Sesión General, en mayo de 2022, se adoptaron las definiciones revisadas del Glosario para “servicios de sanidad de los animales acuáticos”, “autoridad competente” y “autoridad veterinaria” en el *Código Acuático*. Asimismo, se adoptaron las definiciones revisadas del Glosario del *Código Terrestre* para "autoridad competente", "autoridad veterinaria" y "servicios veterinarios". La revisión de estas definiciones se llevó a cabo en coordinación con la Comisión del Código y ambas Comisiones acordaron coordinar la revisión de su uso en el *Código Acuático* y el *Código Terrestre*, respectivamente, en aras de coherencia y cuando fuera pertinente.

En su reunión de septiembre de 2022, ambas Comisiones acordaron coordinar la revisión del uso de estas definiciones en el *Código Acuático* y el *Código Terrestre*, respectivamente, en aras de coherencia y cuando fuera pertinente.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

---

Informe de septiembre de 2022 (ítem 6.1., página 12).

### Reunión de febrero de 2023

En su reunión de febrero de 2023, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó cada una de las menciones a los "servicios de sanidad de los animales acuáticos", "autoridad competente" y "autoridad veterinaria" en el *Código Acuático* y decidió:

- Reemplazar en ciertos usos "servicios de sanidad de los animales acuáticos" por "autoridad competente" con vistas a reflejar la responsabilidad de supervisión de la industria acuícola, incluidos los compartimentos y la expedición de certificados sanitarios internacionales para los animales acuáticos. Por ejemplo, en el Artículo 3.1.2. del Capítulo 3.1. *Calidad de los servicios de sanidad de los animales acuáticos*, cambiar "servicios de sanidad de los animales acuáticos" por "autoridad competente", ya que este uso se refiere a la expedición de certificados sanitarios internacionales para los animales acuáticos. Este cambio garantiza la coherencia en todo el *Código Acuático* con respecto a la autoridad responsable de los certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos.
- Reemplazar "autoridad competente" por "autoridad veterinaria" cuando se haga referencia a la notificación de enfermedades. Esta función diferenciada de una autoridad veterinaria, que incluye los requisitos de notificación de enfermedades y la demostración del cumplimiento de las normas internacionales para el comercio internacional o para el estatus libre de enfermedad, se tuvo en cuenta al elaborar la definición del Glosario.
- Suprimir "servicios veterinarios" en todo el *Código Acuático*, puesto que este término ya no es pertinente en el *Código Acuático*.
- En el punto B.5. de la Guía del usuario, la Comisión aceptó añadir "servicios de sanidad de los animales acuáticos y..." antes de "autoridades competentes" en aras de concordancia con los cambios propuestos en la Guía del usuario del *Código Terrestre*.
- A pesar de la utilización de algunos usos incorrectos de estas definiciones en el Capítulo 3.2. *Comunicación*, la Comisión decidió no hacer ningún cambio por considerar que la corrección del uso no podía introducirse sin una revisión exhaustiva del capítulo. Sin embargo, en el segundo párrafo del Artículo 3.2.1., la Comisión acordó suprimir "La comunicación entre los servicios de sanidad de los animales acuáticos y los servicios veterinarios (sobre todo cuando los servicios de sanidad de los animales acuáticos están separados y son independientes de los servicios veterinarios) es especialmente importante", por considerarlo un texto innecesario.

La Comisión para los Animales Acuáticos destacó que las modificaciones propuestas para el uso de "autoridad competente", "autoridad veterinaria" y "servicios veterinarios" en el *Código Terrestre* se difundieron en el informe de febrero de 2023 de la Comisión del Código. La Comisión insta a los Miembros a considerar ambos informes a la hora de hacer comentarios, habida cuenta del trabajo previo encaminado a garantizar la armonización entre los dos Códigos, según corresponda.

Las enmiendas propuestas a las definiciones de "servicios de sanidad de los animales acuáticos", "autoridad competente" y "autoridad veterinaria" figuran en el [Anexo 13](#) para comentario de los Miembros.

## **8.2. Artículo 1.1.5. del Capítulo 1.1. *Notificación de las enfermedades y aportación de datos epidemiológico***

### Contexto

En su reunión de febrero de 2019, la Comisión del Código acordó suprimir el Artículo 1.1.5. por considerar que la información ya se incluye en el Capítulo 1.6. *Procedimientos para el reconocimiento oficial del estatus zosanitario, la validación de un programa oficial de control y la publicación de una*

---

*autodeclaración de ausencia de enfermedad por la OMSA*. La modificación del Capítulo 1.1. del *Código Terrestre*, que suprime el Artículo 1.1.5., fue adoptada en mayo de 2021.

### Reunión de febrero de 2023

Por su parte, la Comisión para los Animales Acuáticos convino en que los requisitos incluidos en el Artículo 1.1.5. del Capítulo 1.1. *Notificación de enfermedades y presentación de datos epidemiológicos*, se abordaban ahora en el Capítulo 1.4. *Vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos*, recientemente revisado y aprobado. La Comisión decidió suprimir el Artículo 1.1.5. para eliminar la duplicación en el *Código Acuático* y garantizar la armonización con el Capítulo 1.1. del *Código Terrestre*.

El Artículo revisado 1.1.5. del Capítulo 1.1. *Notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos* figura en el **Anexo 14** para comentario de los Miembros.

### **8.3. Artículo 1.3.1. del Capítulo 1.3. *Enfermedades de la lista de la OMSA – Inclusión en la lista de la infección por el todos los genogrupos de la especie de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón***

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Japón, Reino Unido, Tailandia, Taipéi Chino, Miembros de la OMSA de la Región de las Américas, la UE y una declaración conjunta de Brasil, Canadá, Chile, Estados Unidos de América y Nueva Zelanda.

#### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos señaló que otros virus del género *Megalocytivirus*, además del iridovirus de la dorada japonesa (RSIV), pueden causar enfermedades importantes en los peces. Estos virus incluyen otros dos genogrupos del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV): el genogrupo del iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo (TRBIV) y el genogrupo del ISKNV. Los genogrupos ISKNV y TRBIV no se incluyen en el ámbito de aplicación del Capítulo 10.8. *Infección por el iridovirus de la dorada japonesa* del *Código Acuático*.

La Comisión observó que, si los genogrupos ISKNV y TRBIV se incluyen en la lista (además del RSIV), los virus tendrían que evaluarse primero con arreglo a los criterios del Capítulo 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OMSA*. La Comisión solicitó al grupo *ad hoc* que evaluara las especies susceptibles para los tres genogrupos de la especie de virus ISKNV (es decir, RSIV, ISKNV y TRBIV) para ayudar a fundamentar una evaluación con vistas a su inclusión en la lista.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión examinó el informe provisional del grupo *ad hoc* y tomó nota de que no siempre era posible distinguir las especies susceptibles por genogrupo (es decir, susceptibilidad a la infección ya sea por RSIV, ISKNV o TRBIV).

La Comisión evaluó las especies del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (especie ISKNV), incluidos sus tres genogrupos RSIV, ISKNV y TRBIV, con arreglo a los criterios del Capítulo 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OMSA*. La Comisión convino en que la especie ISKNV, incluido el genogrupo RSIV (actualmente inscrito en el *Código Acuático*), así como los dos genogrupos ISKNV y TRBIV cumplen los criterios de inclusión 1, 2, 3 y 4b. Por consiguiente, propuso cambiar el nombre de la enfermedad de la lista por *Infección por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV)* y definirá si se incluyen los tres genogrupos de la especie ISKNV (es decir, ISKNV, RSIV y TRBIV), pero no incluirá el virus de la enfermedad de la caída de escamas o descamación (SDDV), la otra especie reconocida de *Megalocytivirus*.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (Parte B, Ítem 3.1.2.3., página 13); informe de septiembre de 2022 (Ítem 5.1., página 7).

---

## Reunión de febrero de 2023

La Comisión reiteró que la propuesta de inclusión en la lista consistía en modificar el nombre de la enfermedad de la lista, de *Infección por el iridovirus de la dorada japonesa* a *Infección por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón* (ISKNV). Esta propuesta mantendría el genogrupo RSIV como enfermedad de la lista e incluiría también el genogrupo ISKNV y el genogrupo TRBIV. La Comisión observó que, aunque varios Miembros apoyaban el cambio propuesto, otros no lo hacían.

La Comisión reconoció que la nomenclatura de los megalocitivirus causaba cierta confusión. Esto se debe a que "ISKNV" es el nombre de la especie de virus reconocida por el ICTV y es también el nombre de uno de los tres genogrupos reconocidos dentro de la especie de virus. La Comisión revisó y actualizó la evaluación de la infección por la especie viral ISKNV con respecto a los criterios del Capítulo 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OMSA*, en aras de claridad y coherencia de la terminología en todo lo relativo a la especie de virus ISKNV y al genogrupo ISKNV.

La Comisión examinó los comentarios que proponían que el nombre de la lista fuera "infección por *Megalocytivirus*". La Comisión observó que el género *Megalocytivirus* incluye dos especies reconocidas, ISKNV y el virus de la enfermedad de la caída de escamas o descamación (SDDV). El SDDV no está en estudio para su inclusión en la lista, por lo que el nombre propuesto de la enfermedad sería problemático, ya que tendría que definirse para incluir la especie ISKNV pero excluir el SDDV. La Comisión propuso modificar el nombre de la enfermedad en el Artículo 1.3.1. a "Infección por el todos los genogrupos de la especie de virus ISKNV" para aportar claridad sobre el ámbito de aplicación de la enfermedad inscrita en la lista. Se trata de un enfoque similar al utilizado para la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón, que figura en el Capítulo 1.3. *Enfermedades de la lista de la OMSA*, como "Infección por las variantes con supresión en la HPR y HPR0 del virus de la anemia infecciosa del salmón".

La Comisión remitió a los Miembros a los informes de abril y noviembre/diciembre de 2022 del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA para conocer los detalles de las evaluaciones realizadas sobre la susceptibilidad a la infección con las especies ISKNV. El informe del Grupo *ad hoc* describe las especies susceptibles a la infección por la especie de virus ISKNV y, en la medida de lo posible, cada genogrupo. Dicho informe ayudará a los Miembros a determinar el ámbito de aplicación de las normas para la infección por la especie de virus ISKNV. La Comisión convino en aplazar las enmiendas al Artículo 10.8.2. del Capítulo 10.8. *Infección por el iridovirus de la dorada japonesa*, basadas en las recomendaciones del informe del grupo *ad hoc*, hasta que los Miembros hayan examinado la propuesta de incluir en la lista la infección por la especie del virus ISKNV. El informe del grupo *ad hoc* puede consultarse en el sitio web de la OMSA ([Grupos ad hoc - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](https://www.woah.org))

La Comisión examinó los comentarios recibidos y concluyó que la información proporcionada en la evaluación de la infección por la especie de virus ISKNV con respecto a los criterios del Capítulo 1.2. *Criterios de inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OMSA*, era sólida y reiteró que la evaluación apoyaba la inscripción en la lista de todos los genogrupos, incluidos RSIV, ISKNV y TRBIV. La Comisión observó que existía una justificación convincente para la inclusión en la lista a nivel de las especies de virus, ya que los tres genogrupos tienen especies susceptibles que se superponen, una epidemiología y métodos de diagnóstico similares, como se destacó en el informe del grupo *ad hoc*.

La Comisión señaló que la mayoría de los comentarios recibidos se centraban en tres puntos: el carácter generalizado del genogrupo ISKNV, la validación de las pruebas de diagnóstico para el genogrupo TRBIV y las ventajas de su inclusión en la lista. La Comisión acordó responder colectivamente a estos tres puntos y no dar comentarios individuales.

### 1) Carácter generalizado del genogrupo ISKNV

Varios comentarios cuestionaron el cumplimiento del Criterio nº 2 teniendo en cuenta la naturaleza generalizada del genogrupo ISKNV, especialmente en los peces ornamentales. La Comisión observó que el Criterio nº 2 requiere que al menos un país pueda demostrar en el país o en una

---

zona la ausencia de enfermedad basándose en las disposiciones del Capítulo 1.4. La Comisión subrayó que algunos países disponen de condiciones elementales de bioseguridad para todos los genogrupos de la especie del virus ISKNV y han llevado a cabo una vigilancia específica. La Comisión convino en que confiaba en que al menos un Miembro se declarara libre de la especie de ISKNV.

La Comisión tomó nota de algunos comentarios según los cuales, sin la inclusión en la lista (y la disponibilidad de las normas asociadas de la OMSA), era posible que el diseño de los programas de vigilancia existentes no contemplara todas las especies susceptibles conocidas y que, por lo tanto, se desconociera la verdadera distribución geográfica de la enfermedad objeto de la evaluación. La Comisión explicó que un argumento de este tipo podía aplicarse a cualquier nueva inclusión en la lista y que, por esa razón, el criterio es prospectivo, es decir, "...al menos un país puede...". La Comisión convino en que confiaba en que al menos un Miembro declarara la ausencia de infección por todos los genogrupos de la especie de virus ISKNV.

## 2) Validación de las pruebas de diagnóstico para el genogrupo TRBIV:

La Comisión estuvo de acuerdo con que existían algunas limitaciones en la validación de las pruebas de diagnóstico para la detección del genogrupo TRBIV debido a la escasa disponibilidad de tejidos infectados por TRBIV. Sin embargo, observó que existían diversos métodos que incluían los tres genogrupos (Kawato *et al.*, 2021a, Koda *et al.*, 2023 y Kim *et al.*, 2022). Kawato *et al.*, 2021a, demostró que tres de las cuatro pruebas PCR en tiempo real tienen la capacidad de detectar los genogrupos RSIV, ISKNV y TRBIV. Sin embargo, para TRBIV esto se determinó utilizando plásmidos sintetizados y no muestras de tejido.

La Comisión apoyó un comentario que solicitaba la realización de un trabajo específico encaminado a efectuar un estudio comparativo entre laboratorios, con el fin de evaluar el rendimiento de los métodos de diagnóstico, incluidos los genotipos RSIV, ISKNV y TRBIV. Sin embargo, la Comisión indicó que dicho trabajo se veía limitado por la disponibilidad de tejidos TRBIV positivos. La Comisión pidió a los Miembros que tuvieran acceso a tejidos positivos al TRBIV que lo comunicasen a la OMSA de tal forma que se pudiera efectuar una validación adicional de los métodos disponibles.

En conclusión, la Comisión convino en que se disponía de suficientes herramientas de diagnóstico para detectar la especie ISKNV, incluidos sus tres genogrupos, y para elaborar definiciones de caso apropiadas. Pese a que se requieren estudios adicionales sobre la precisión del diagnóstico, en particular utilizando tejidos infectados por TRBIV, esto no constituye un impedimento para que se cumpla este criterio.

## 3) Ventajas de la inclusión en la lista

La Comisión convino en que, en general, la evaluación de la infección por las especies ISKNV con respecto a los criterios de inclusión en la lista de enfermedades de los animales acuáticos demuestra que se cumplen todos los criterios pertinentes para apoyar su inscripción. Además, destacó que el grupo *ad hoc* había indicado que no siempre era posible la identificación de especies susceptibles al nivel del genogrupo ISKNV específico y que los tres genogrupos presentaban signos clínicos, histopatología y epidemiología similares. La Comisión también afirmó que la inscripción propuesta era coherente con otras enfermedades de la lista para las que el agente patógeno puede estar compuesto por diferentes genotipos o cepas.

La Comisión consideró algunos comentarios según los cuales la inclusión en la lista de las especies del virus ISKNV crearía problemas logísticos y de recursos, en particular en relación con las especies susceptibles que se comercializan internacionalmente, como los peces ornamentales. La Comisión indicó que, si las normas se aplicaban correctamente, cualquier medida comercial para las especies del virus ISKNV sólo tendría importancia para el comercio entre países con estatus sanitario diferente. Igualmente, señaló que las normas pretendían apoyar el comercio proporcionando un conjunto de medidas sanitarias comunes.

---

La Comisión desea recordar a los Miembros que una de las recomendaciones de la “Conferencia mundial sobre la sanidad de los animales acuáticos” celebrada en Chile en abril de 2019, basada en las solicitudes de los Miembros, fue la de brindar en el *Código Acuático* una orientación adicional para el comercio de animales acuáticos ornamentales. El genogrupo ISKNV es un patógeno clave de preocupación en las especies de peces ornamentales comercializadas internacionalmente, lo que respalda la inclusión en la lista. Si bien el virus no causa, en todos los casos, una morbilidad y mortalidad significativas en las especies de peces ornamentales, la Comisión observó que el genogrupo ISKNV afectaba a otras especies acuícolas importantes (por ejemplo, tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), lubina (*Lates calcarifer*), perca atruchada (*Micropterus salmoides*), *Epinephelus coioides*, mero de Malabar (*Epinephelus malabaricus*), pez mandarín (*Siniperca chuatsi*)) que son objeto de comercio internacional.

La evaluación revisada de la infección por el todos los genogrupos de la especie de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón según los criterios del Capítulo 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OMSA* figura en el [Anexo 16](#) para información de los Miembros.

El Artículo revisado 1.3.1. del Capítulo 1.3. *Enfermedades de la lista de la OMSA* figura en el [Anexo 15](#) para comentario de los Miembros.

#### **8.4. Mercancías seguras – Artículos X.X.3. para los capítulos específicos de enfermedad**

##### Contexto

En su reunión de septiembre de 2020, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Artículo X.X.3. de todos los capítulos específicos de enfermedad, con el fin de responder a los comentarios que indicaban que los tratamientos de tiempo/temperatura recomendados en estos artículos representaban diferentes niveles de tratamiento térmico y que algunos no eran comercialmente viables ya que disminuirían la calidad del producto.

Entre septiembre de 2020 y febrero de 2022, la Comisión difundió propuestas de modificación de los Artículos X.X.3. en todos los capítulos específicos de enfermedad del *Código Acuático* para reflejar este enfoque revisado. En mayo de 2022, se adoptaron las enmiendas propuestas en los Artículos 9.X.3. y 10.X.3.

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión tomó nota de que las evaluaciones realizadas anteriormente con arreglo a los "Criterios para evaluar la seguridad de los productos de animales acuáticos importados (o en tránsito) cualquiera que sea el uso, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la enfermedad X" (como se describe en el Artículo 1.4.1.) debían revisarse en función de cualquier nueva prueba sobre la estabilidad térmica, y solicitó que se contratara a un consultor para llevar a cabo esta revisión.

##### Reunión de febrero de 2023

La Comisión analizó las evaluaciones de mercancías seguras que se habían llevado a cabo para todos los productos de animales acuáticos enumerados en el Artículo X.X.3. en todos los capítulos específicos de enfermedad, con el fin de aplicar el nuevo enfoque y la nueva información científica cuando fuera relevante. La Comisión reconoció la gran cantidad de trabajo necesario para llevar a cabo esta revisión.

La Comisión se mostró de acuerdo con todas las modificaciones recomendadas del tiempo/temperatura de inactivación identificadas en las evaluaciones.

La Comisión animó a los investigadores que trabajan en la inactivación de patógenos a aplicar una serie de combinaciones de tiempo y temperatura a efectos de garantizar que se disponga de información suficiente para desarrollar valores z, ya que esto ayudaría a los Miembros a determinar el tiempo y la temperatura equivalentes para la inactivación de agentes patógenos.

---

La Comisión solicitó que las evaluaciones de mercancías seguras para las enfermedades de los animales acuáticos de la lista de la OMSA, actualmente disponibles en el sitio web de la Organización, se actualizaran con las evaluaciones revisadas. Mientras tanto, las evaluaciones actualizadas de las mercancías seguras se publicarán en el sitio web de la OMSA a título informativo. Se recomienda a los Miembros que consulten estas evaluaciones cuando examinen las propuestas de modificación de los Artículos X.X.3. que se presentan para comentario (Ver ítems 8.4.1. a 8.4.4.). Las evaluaciones sobre las mercancías seguras pueden consultarse en el sitio web de la OMSA en: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/procedimiento-de-elaboracion-de-normas/comision-para-los-animales-acuaticos/>

#### **8.4.1. Artículos 8.X.3. para los capítulos específicos de las enfermedades de los anfibios**

Se recibieron comentarios de Noruega, Suiza, Taipéi Chino y la UE.

##### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión modificó el Artículo 8.X.3. para alinearlo con las enmiendas adoptadas recientemente en los Artículos 9.X.3. y 10.X.3. en relación con un enfoque revisado de los tratamientos de tiempo/temperatura y lo distribuyó para comentario de los Miembros.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2020 (Ítem 4.7., página 10); informe de febrero de 2021 (Parte B: Ítem 1.4., página 8); informe de septiembre de 2021 (Ítem 5.1.5., página 24) e informe de febrero de 2022 (Parte B: Ítem 2.1.1.1., página 5).

##### Reunión de febrero de 2023

La Comisión examinó las evaluaciones de las mercancías seguras de los productos enumerados en los Artículos 8.X.3. y las modificó en consecuencia.

En el apartado 2, estuvo de acuerdo con un comentario según el cual los productos de anfibios secados por medios mecánicos son un subconjunto de los productos de animales acuáticos sometidos a un tratamiento térmico y propuso suprimir este apartado para eliminar la duplicación.

La Comisión suprimió los productos secados por medios mecánicos de todos los Artículos X.X.3., cuando fuera procedente, en aras de armonización con los capítulos específicos de enfermedad.

Los Artículos revisados 8.1.3., 8.2.3. y 8.3.3. figuran en el **Anexo 17** con control de cambios y en versión limpia para comentario de los Miembros.

#### **8.4.2. Artículos 9.X.3. para los capítulos específicos de los crustáceos**

##### Febrero de 2023

La Comisión examinó las evaluaciones de las mercancías seguras de los productos enumerados en los Artículos 9.X.3. y las modificó en consecuencia.

La Comisión acordó presentar únicamente los Artículos 9.X.3. en los que los tratamientos de tiempo/temperatura habían cambiado como resultado de la actualización de las evaluaciones de las mercancías seguras. La Comisión observó que, anteriormente, los Artículos 9.X.3. no incluían los productos de crustáceos secados por medios mecánicos y que, por lo tanto, no existían otros cambios armonizados en todos los capítulos específicos de las enfermedades de los crustáceos.

Los Artículos revisados 9.3.3., 9.5.3., 9.6.3., 9.7.3. y 9.10.3. figuran en el **Anexo 18** con control de cambios y en versión limpia, respectivamente, para comentario de los Miembros.

---

### **8.4.3. Artículos 10.X.3. para los capítulos específicos de los peces**

#### Febrero de 2023

La Comisión examinó las evaluaciones de las mercancías seguras de los productos enumerados en los Artículos 10.X.3. y los modificó en consecuencia.

En el apartado 2, la Comisión se mostró de acuerdo con un comentario que indicaba que los productos de peces secados por medios mecánicos eran un subconjunto de los productos de animales acuáticos sometidos a un tratamiento térmico y propuso suprimir este apartado para eliminar la duplicación.

La Comisión suprimió los productos secados por medios mecánicos de todos los Artículos X.X.3., cuando proceda, en aras de armonización con los capítulos específicos de enfermedad.

Los Artículos revisados 10.1.3., 10.2.3., 10.3.3., 10.4.3., 10.5.3., 10.6.3., 10.7.3., 10.8.3., 10.9.3. y 10.10.3. figuran en el **Anexo 19** con control de cambios y en versión limpia para comentario de los Miembros.

### **8.4.4. Artículos 11.X.3. para los capítulos específicos de los moluscos**

Se recibieron comentarios de China (Rep. Pop. de), Noruega, Suiza y la UE.

#### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión modificó el Artículo 11.X.3. en aras de armonización con las modificaciones adoptadas recientemente en los Artículos 9.X.3. y 10.X.3. en relación con un enfoque revisado de los tratamientos de tiempo/temperatura y lo distribuyó para comentario de los Miembros.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2020 (ítem 4.7., página 10); informe de febrero de 2021 (Parte B: Ítem 1.4., página 8); informe de septiembre de 2021 (ítem 5.1.5., página 24) e informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 2.1.1.2., página 5).

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión examinó las evaluaciones de las mercancías seguras de los productos enumerados en los Artículos 11.X.3. y los modificó en consecuencia.

En el apartado 2 del Artículo 11.1.3., la Comisión acordó que los productos del abulón secados por medios mecánicos son un subconjunto de productos de animales acuáticos sometidos a un tratamiento térmico. La Comisión acordó suprimir los productos secados por medios mecánicos de todos los Artículos X.X.3. para armonizarlos con los capítulos específicos de enfermedad.

La Comisión destacó que la actualización de la evaluación de las mercancías seguras evaluaba el tiempo/las temperaturas de inactivación para todos los patógenos de moluscos. Por consiguiente, en el Artículo 11.2.3. del Capítulo 11.2. *Infección por Bonamia exitiosa* y en el Artículo 11.3.3. del Capítulo 11.3. *Infección por Bonamia ostrea*, acordó añadir un nuevo apartado 1, con el fin de incluir como mercancías seguras los productos de animales acuáticos que hayan sido sometidos a un tratamiento térmico con fines de armonización con otros capítulos específicos de enfermedad.

Los Artículos revisados 11.1.3., 11.2.3., 11.3.3., 11.4.3., 11.5.3., 11.6.3. y 11.7.3. figuran en el **Anexo 20**, con control de cambios y en versión limpia, respectivamente, para comentario de los Miembros.

---

## 8.5. Artículos 11.5.1. y 11.5.2. del Capítulo 11.5. Infección por *Perkinsus marinus*

### Contexto

El Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA se reunió en noviembre-diciembre de 2022 para proseguir su trabajo de aplicación de los criterios del Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico*. En esta reunión, el grupo *ad hoc* llevó a cabo las evaluaciones de susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por *Perkinsus marinus*.

### Reunión de febrero de 2023

La Comisión para los Animales Acuáticos estudió el informe del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA y felicitó a sus integrantes por su exhaustivo trabajo.

La Comisión acordó modificar la lista de especies susceptibles del Artículo 11.5.2. de acuerdo con las recomendaciones del grupo *ad hoc*, es decir:

- Se consideró que dos especies actualmente incluidas en el Artículo 11.5.2., la ostra americana (*Crassostrea virginica*) y la ostra de Suminoe *Magallana* [*Syn. Crassostrea*] *ariakensis*, cumplían los criterios de inclusión en la lista como susceptibles a la infección por *P. marinus* y, por lo tanto, se propone que permanezcan en el Artículo 11.5.2.
- Se determinó que dos nuevas especies susceptibles, la ostra de Cortés (*Crassostrea corteziensis*) y la ostra palmeada (*Saccostrea palmula*), reúnen los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles a la infección por *P. marinus* y, por lo tanto, se propone añadirlas al Artículo 11.5.2.
- Se evaluaron cuatro especies que figuran actualmente en el Artículo 11.5.2., *Macoma balthica*, la almeja americana (*Mercenaria mercenaria*), la ostra del Pacífico (*Magallana* [*Syn. Crassostrea*] *gigas*) y la almeja del río (*Mya arenaria*), y se observó que no cumplían los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles a la infección por *P. marinus*, por lo que se propone su supresión del Artículo 11.5.2.

Las secciones pertinentes del Capítulo 2.4.4. *Infección por Perkinsus marinus* del *Manual Acuático* también se modificaron de acuerdo con las recomendaciones del grupo *ad hoc* (ver ítem 11.2.1.).

La Comisión insta a los Miembros a consultar el informe del grupo *ad hoc* de noviembre/diciembre de 2022, disponible en el sitio web de la OMSA, para obtener información detallada sobre las evaluaciones realizadas por el grupo *ad hoc*.

La Comisión también modificó el Artículo 11.5.1. por razones de coherencia con el enfoque adoptado en otros capítulos específicos de las enfermedades de los moluscos.

Los Artículos revisados 11.5.1. y 11.5.2. del Capítulo 11.5. *Infección por Perkinsus marinus* figuran en el [Anexo 21](#) para comentario de los Miembros.

## 9. Ítems para información de los Miembros

### 9.1. Enfermedades emergentes

#### Contexto

Uno de los ítems permanentes del orden del día de cada reunión de la Comisión para los Animales Acuáticos es el examen de la información científica sobre las enfermedades emergentes, con el fin de determinar si los Miembros de la OMSA deben considerar la enfermedad como enfermedad emergente

---

o si se justifican otras medidas. En este aspecto, la Comisión tomó en consideración las solicitudes de otras fuentes, como los Miembros de la OMSA, los expertos y los centros de referencia.

### **9.1.1. Infección por el virus del edema de la carpa**

Se recibieron comentarios de Japón.

#### Contexto

En su reunión de febrero de 2020, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó la información científica sobre la infección por el virus del edema de la carpa y acordó que esta enfermedad cumplía con la definición de la OMSA de "enfermedad emergente", de acuerdo con el Artículo 1.1.4. del Capítulo 1.1. *Notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos del Código Acuático*.

En sus reuniones de febrero de 2021 y septiembre de 2021, la Comisión revisó los comentarios de los Miembros y las nuevas pruebas científicas y acordó que cumplía la definición de "enfermedad emergente" de la OMSA, al tiempo que destacó que la infección por el virus del edema de la carpa seguía causando mortalidad en poblaciones silvestres y de granja, pero que la gravedad del impacto en la producción no estaba clara.

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión revisó las nuevas pruebas científicas y subrayó que, cada año, se publicaban más informes de detecciones y mortalidades causadas por la infección por el virus del edema de la carpa. La Comisión reconoció la incertidumbre en cuanto al impacto en la producción de la infección por el virus del edema de la carpa y el alcance de la propagación a escala mundial, en particular en Europa, y convino en que cumplía con la definición de "enfermedad emergente" de la OMSA.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión examinó nuevas pruebas científicas y tomó nota de que, desde su reunión de febrero de 2022, se habían notificado más brotes en la región de Asia-Pacífico. La Comisión convino en que la infección por el virus del edema de la carpa seguía cumpliendo con la definición de "enfermedad emergente" de la OMSA. Una vez más, la Comisión solicitó a los Miembros que facilitasen toda la información pertinente sobre la infección por el virus del edema de la carpa para que la Comisión pudiera considerar el cumplimiento de los criterios de inclusión en la lista de la OMSA (Capítulo 1.2.) o si ya no debía considerarse una enfermedad emergente.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Febrero de 2020 (ítem 7.3.3., página 17); septiembre de 2020 (ítem 6.3., página 17); febrero de 2021 (Parte B: ítem 2.2., página 11); septiembre de 2021 (ítem 5.2.1.1., página 27); febrero de 2022 (Parte B: Ítem 2.2.1.1., página 6) y septiembre de 2022 (Ítem 6.2.1., página 12).

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión indicó que sólo se había recibido un comentario en respuesta a su solicitud de información pertinente sobre la infección por el virus del edema de la carpa para que la Comisión pudiera decidir si debían aplicarse los criterios de inclusión en la lista o si debía dejar de considerarse una enfermedad emergente.

La Comisión examinó las pruebas aportadas y observó que la infección por el virus del edema de la carpa podía ser una enfermedad de importancia regional, aunque existieran ciertas diferencias entre las cepas y los niveles de virulencia.

La Comisión convino en que, por el momento, la infección por el virus del edema de la carpa no justificaba una evaluación con respecto a los criterios de inscripción en la lista y observó que no había interés por parte de los Miembros de disponer de normas que guíen la gestión de la infección

---

por el virus del edema de la carpa. Además, los Miembros no han notificado la infección por el virus del edema de la carpa como enfermedad emergente a través de la plataforma WAHIS de la OMSA desde que la Comisión la consideró enfermedad emergente en febrero de 2020.

La Comisión convino en que la infección por el virus del edema de la carpa ya no respondía a la definición de "enfermedad emergente". La Comisión destaca que en el futuro, si cambiaba la situación de la infección por el virus del edema de la carpa y se aportaban nuevas pruebas científicas, se podía volver a examinar el cumplimiento de los criterios de inclusión en la lista.

La Comisión indicó que los Miembros que desearan aplicar medidas contra la infección por el virus del edema de la carpa podían hacerlo en base a un análisis de riesgos.

La Comisión revisó la ficha de la enfermedad de la infección por el virus del edema de la carpa y aceptó añadir el tratamiento en un baño salino como posible medida de control. Informó a los Miembros de que la ficha revisada de la infección por el virus del edema de la carpa está disponible en el [sitio web de la OMSA](#).

### **9.1.2. Infección por el nodavirus de la mortalidad encubierta (CMNV)**

No se recibió ningún comentario.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos examinó la información científica disponible sobre el nodavirus de la mortalidad encubierta (CMNV) y convino en que la infección por CMNV respondía a la definición de enfermedad emergente y debía notificarse a la OMSA de conformidad con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (Ítem 6.2.2., página 13).

#### Reunión de febrero de 2023

No se recibieron comentarios de los Miembros.

La Comisión examinó la información científica relativa a la infección por el nodavirus de la mortalidad encubierta (CMNV) y convino en que la infección por CMNV sigue respondiendo a la definición de "enfermedad emergente" y debe notificarse a la OMSA de conformidad con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*.

La Comisión animó a los Miembros a investigar los casos de mortalidad y morbilidad en las diversas especies de animales acuáticos afectadas, haciendo hincapié en que una mejor comprensión del virus es esencial para controlar su posible propagación y sus repercusiones en las poblaciones de animales acuáticos.

La Comisión informó a los Miembros de la elaboración de una ficha técnica sobre la enfermedad, disponible en [el sitio web de la OMSA](#).

### ***Manual de pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OMSA***

La Comisión para los Animales Acuáticos recordó a los Miembros el inicio del proceso de modificación progresiva del formato de los capítulos específicos de enfermedad del *Manual Acuático* a partir de un nuevo modelo. Dado que los capítulos reformateados y actualizados presentan cambios sustanciales, la Comisión acordó, en su reunión de septiembre de 2019, que en sus informes sólo se presentarían versiones limpias de los capítulos, sin cambios aparentes. Los cambios posteriores realizados en estas revisiones iniciales a raíz

de los comentarios de los Miembros se indicarán con el estilo habitual (es decir, ~~tachado para las supresiones~~ y doble subrayado para las adiciones).

Se creará un documento comparativo entre la versión adoptada de un capítulo y el nuevo texto propuesto. Este documento no se incluye en el informe de la Comisión, pero estará disponible si se solicita al Departamento de Normas de la OMSA ([AAC.Secretariat@WOAH.org](mailto:AAC.Secretariat@WOAH.org)).

La Comisión reflexionó sobre la mejor manera de comunicar las modificaciones del *Manual Acuático* para que los Miembros puedan leer y comprender con mayor facilidad las decisiones de la Comisión en respuesta a los comentarios. La Comisión decidió presentar la información en cuadros, en los que se indica la ubicación en el capítulo, un resumen del comentario y la decisión. La Comisión agradece todos los comentarios de los Miembros sobre este nuevo formato de informe.

Algunos Miembros enviaron los mismos comentarios para todos los capítulos del *Manual Acuático* que circularon en el informe de septiembre. La Comisión para los Animales Acuáticos abordó estos comentarios del siguiente modo:

Sección/ párrafo	Comentario	Decisión
2.3.6. <i>Distribución geográfica</i>	Cambiar el título "Distribución geográfica"	<b>En desacuerdo:</b> " <i>geographical</i> " es el término correcto en inglés británico, que es el que utiliza la OMSA.
3.5.2. <i>Conservación de muestras para la detección molecular</i>	Presentar una referencia que confirme que se acepta la congelación de las muestras.	Añadir la siguiente frase a los capítulos con información general: "Las muestras de vigilancia para demostrar la ausencia de enfermedad se deberán tomar, almacenar y analizar en un plazo que minimice la degradación de la muestra y maximice la probabilidad de que el analito se detecte si está presente." "Los métodos estándar de toma, conservación y procesamiento de muestras para técnicas moleculares se pueden consultar en la Sección B.5.5. del Capítulo 2.2.0. <i>Información general</i> (enfermedades de los crustáceos)."
4.4. <i>Amplificación de ácido nucleico;</i> párrafo: <i>Extracción de ácido nucleico</i>	Aclarar el texto	<u>Se pueden utilizar numerosos diferentes kits y procedimientos para la extracción de ácido nucleico. La calidad y la concentración del ácido nucleico extraído son importantes y deberán comprobarse mediante un método adecuado a las circunstancias utilizando la densidad óptica o recurriendo a un gel.</u>
4.4.1. <i>PCR en tiempo real</i> y 4.4.2. <i>PCR convencional:</i> <i>tablas sobre secuencias de cebadores y sondas y parámetros de ciclado para la PCR</i>	Aclarar el texto de los títulos	Sustituir el tamaño del "producto" por el tamaño del "amplicón"; suprimir "sondas" de la tabla PCR convencional; para la PCR anidada, las secuencias deben etiquetarse como "primaria" y "anidada" en lugar de "interna" y "externa".

Sección/ párrafo	Comentario	Decisión
4.5. <i>Secuenciación de amplicones</i>	Aclarar el texto de los títulos	Deberá verificarse el tamaño del amplicón de la prueba PCR, <u>por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa y deberá purificarse por escisión de este gel. Las dos cadenas de ADN del producto de la PCR deberán secuenciarse y analizarse y compararse en comparación con las secuencias de referencia.</u>
6. <i>Criterios de diagnóstico corroborativo</i>	Eliminar el requisito de que todas las pruebas presuntamente positivas se envíen al correspondiente laboratorio de referencia de la OMSA: no es necesario si el país tiene capacidad para confirmar la prueba presuntamente positiva. El resultado positivo se notificará a la OMSA a través del sistema WAHIS. También es posible que no exista un laboratorio de referencia de la OMSA específico para la enfermedad en cuestión. Este requisito carece de coherencia con el <i>Manual Terrestre</i> .	Borrar: " <i>It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case.</i> " Ilustrar que el párrafo se refiere a la capacidad de diagnóstico mediante los cambios en la frase siguiente: "If a <u>laboratory-Competent Authority</u> does not have the <u>capacity-capability</u> to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, <u>and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.</u> " En el caso de las enfermedades para las que no existan laboratorios de referencia de la OMSA, se añadirá: "actualmente no existen laboratorios de referencia de la OMSA designados para esta enfermedad".
6. <i>Criterios de diagnóstico corroborativo</i>	¿Cuál es la postura de la Comisión respecto al ADN?	La posición de la Comisión sobre los métodos de ADN se destaca en su documento de debate: <u>Uso de los métodos de ADN ambiental (ADNa) para la detección de las enfermedades de los animales acuáticos de la lista de la OMSA</u> . Actualmente, los métodos de ADN sólo se recomiendan para una enfermedad de la lista ( <i>Gyrodactylus salaris</i> ).
6.1. <i>Animales aparentemente sanos o de estado sanitario desconocido</i>	Sustituir "proximidad hidrográfica" por "vínculo hidrográfico".	Mantener la proximidad "hidrográfica" ya que se trata del término correcto

Sección/ párrafo	Comentario	Decisión
6.1.2. <i>Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos</i> y 6.2.2. <i>Definición de caso confirmado en animales clínicamente afectados</i>	El bioensayo no es lo suficientemente específico para ser utilizado como prueba de confirmación	<b>De acuerdo.</b> Un resultado positivo al bioensayo indica una sospecha de infección, pero para confirmar la infección se requiere otro método como prueba de identificación del agente. El bioensayo se eliminará de todas las definiciones de caso confirmado.
6.3. <i>Sensibilidad y especificidad diagnósticas para las pruebas de diagnóstico</i> , Tabla 6.3.2. <i>Vigilancia de animales aparentemente sanos</i>	Suprimir la Tabla 6.3.2 hasta que se disponga de datos.	Mantener la Tabla 6.3.2., pero añadir "no se dispone actualmente de datos" al texto del primer párrafo de la sección. La Comisión acordó previamente mantener las tablas vacías en la Sección 6 para dejar en claro la falta de datos sobre el rendimiento del diagnóstico.

Las modificaciones descritas anteriormente se aplicarán a todos los capítulos que se propongan para adopción en mayo de 2023 o que se distribuyan para comentario de los Miembros, cuando corresponda.

## 10. Textos que se propondrán para adopción en mayo de 2023

### 10.1. Sección 2.2. *Enfermedad de los crustáceos*

#### 10.1.1. Capítulo 2.2.1. *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido, Taipéi Chino y la UE.

##### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.1. *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda*, actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado en base al nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión modificó el capítulo propuesto tras considerar los comentarios de los Miembros. La Comisión acordó revisar toda la información publicada sobre las especies distintas de *Vibrio parahaemolyticus* que se han asociado con la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda, en consulta con los dos laboratorios de referencia de la OMSA.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 3.1.1.1., página 9) y septiembre de 2022 (ítem 7.1.2., página 15).

##### Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
1. <i>Ámbito de aplicación</i>	Suprimir la última frase, ya que se han encontrado otras especies de <i>Vibrio</i> portadoras de plásmidos patógenos y causantes de la muerte de langostinos.	De acuerdo. La Comisión seguirá reuniendo las conclusiones de los laboratorios de referencia para supervisar los progresos en las pruebas científicas que puedan justificar un cambio en el ámbito de aplicación del capítulo.
2.3.2. <i>Signos clínicos, incluidos los cambios de comportamiento</i>	Aclarar el texto, ya que el hundimiento en el fondo del tanque es un cambio de comportamiento y no un signo clínico.	De acuerdo. Se modificó el texto en consecuencia.
3.2. <i>Selección de órganos o tejidos</i>	Añadir el estómago como órgano adecuado para la toma de muestras.	En desacuerdo. No se proporcionó ninguna referencia junto con el comentario.
Tabla 4.1. <i>Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados</i>	Sustituir "cultivo celular" por "aislamiento", ya que la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda es la infección con cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> que contienen un plásmido que no requiere cultivo celular.	De acuerdo. Se realizó el reemplazo para el diagnóstico presuntivo de animales clínicamente afectados, tal y como se describe en el capítulo.
		Bioensayo suprimido para el diagnóstico de confirmación de un resultado sospechoso de vigilancia o de diagnóstico presuntivo (ver más arriba la tabla de la introducción de la sección del <i>Manual Acuático</i> de este informe).
4.2. <i>Histopatología y citopatología</i>	Redactar nuevamente la sección debido a incoherencias con otros capítulos y añadir referencias más recientes como Ananda Raja <i>et al.</i> (2017).	En desacuerdo. Para la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda es importante describir las fases de la enfermedad. Ananda Raja <i>et al.</i> no describen su patología, sino la de <i>V. parahaemolyticus</i> que no causa esta enfermedad. Los cambios histopatológicos causados por <i>V. parahaemolyticus</i> no causantes de la enfermedad son bastante diferentes. Se añadieron más detalles al texto.
4.4. <i>Amplificación del ácido nucleico</i>	El protocolo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) se menciona en la Tabla 4.1 y se utiliza para el diagnóstico corroborativo en la Sección 6. <i>Criterios de diagnóstico corroborativo</i> , pero en la Sección 4.4. no se brinda ningún método detallado.	De acuerdo. Se agregó una nueva Sección 4.3 <i>Protocolo de amplificación isotérmica mediada por bucle</i> que incluye uno de los parámetros como para los protocolos PCR.

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
4.4.2. <i>PCR convencional</i> , Tabla de los parámetros de ciclado	Fusionar los métodos 7 y 8 ya que son dos pasos de la misma prueba PCR anidada.	De acuerdo. Suprimir también los métodos 1 y 2, ya que se han desarrollado métodos mejorados.
6.1.1. <i>Definición de caso sospechoso en poblaciones aparentemente sanas</i>	Añadir un resultado positivo por aislamiento y por bioensayo.	En desacuerdo. no es probable que estas pruebas se utilicen en animales aparentemente sanos.
6.2.1. <i>Definición de caso sospechoso en animales clínicamente afectados</i>	Añadir un resultado positivo por aislamiento y por bioensayo.	De acuerdo.

El Capítulo revisado 2.2.1. *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda* figura en el [Anexo 22](#) y se presentará para adopción en la 90.ª Sesión General en mayo de 2023.

#### 10.1.2. Capítulo 2.2.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido y la UE.

##### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)*, actualizado por el experto del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo específico de enfermedad.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión modificó el capítulo propuesto tras considerar los comentarios de los Miembros.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de (Parte B: ítem 3.1.1.2., página 10) y septiembre de 2022 (ítem 7.1.4., página 17).

##### Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
2.3.1. <i>Mortalidad, morbilidad y prevalencia</i>	Aclarar que el periodo de incubación y la gravedad de la enfermedad dependen en cierta medida del tamaño o de la edad.	Añadir "siendo siempre los juveniles los más gravemente afectados".
2.3.1. <i>Mortalidad, morbilidad y prevalencia</i>	Suprimir el texto: no tiene sentido práctico comparar la mortalidad entre los reproductores afectados por la Infección por <i>Hepatobacter penaei</i> y los que no lo están.	De acuerdo.

Sección/parágrafo	Comentario	Decisión
3.2. <i>Selección de órganos o tejidos</i>	Aclarar la finalidad de seleccionar el hepatopáncreas como muestra preferente.	En desacuerdo. La frase es clara tal como está escrita.
Tabla 4.1. <i>Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados</i>	Suprimir el bioensayo para el diagnóstico de confirmación de un resultado sospechoso, ya que un resultado positivo del bioensayo indica sospecha de infección, pero debe confirmarse mediante otro método.	De acuerdo. Se eliminó la Sección 6.2.2. <i>Definición de caso confirmado en animales clínicamente afectados</i> (ver la tabla con los cambios armonizados para todos los capítulos anteriores).
4.2. <i>Histopatología y citopatología</i>	Añadir que se recomiendan métodos moleculares para el "cribado de la población para la infección por <i>H. penaei</i> ", en aras de coherencia con el <i>Código Acuático. Creo</i>	De acuerdo.
4.4.1. <i>PCR en tiempo real</i> y 4.4.2. <i>PCR convencional: tablas sobre secuencias de cebadores y sondas y parámetros de los ciclos de PCR</i>	Añadir el nombre del gen a las tablas.	De acuerdo. Además, como el título de la columna es "patógeno/gen diana", se añadió el patógeno. En el texto de la versión inglesa, cambió " <i>Flg</i> " por " <i>flagella hook gene</i> " en el texto cuando fuera relevante.

El Capítulo revisado 2.2.3. Infección por *Hepatobacter penaei* (hepatopancreatitis necrotizante figura en el [Anexo 23](#) y se presentará para adopción en la 90.ª Sesión General de mayo de 2023.

#### 10.1.3. Capítulo 2.2.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHNV)*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido, Taipéi Chino y la UE.

##### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa* actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión modificó el capítulo propuesto tras considerar los comentarios de los Miembros.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 3.1.1.3., página 10) y septiembre de 2022 (ítem 7.1.5., página 18).

##### Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
2.1.1. <i>Agente etiológico</i>	Añadir texto declarando que los genotipos de la IHHNV en Ecuador y Perú se encontraron dentro de un linaje separado de los genotipos del IHHNV tipo 2 que circulan dentro de dichos países.	De acuerdo.
2.2.2. <i>Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad</i>	Comprobar si las cinco especies de peces de aleta suprimidas en el texto deben figurar en la tabla.	La regla indica que, si existen más de 10 especies, deben enumerarse en formato de tabla. Como había más de 10, todas las especies enumeradas inicialmente en el texto se incorporaron en la tabla.
	Añadir una leyenda a la tabla.	En desacuerdo. No es necesario.
2.3. <i>Cuadro clínico</i>	Reorganizar la información de las Secciones 2.3.1.-2.3.3. para adoptar un enfoque diferente a la hora de describir el modelo de la enfermedad en términos de infección aguda o crónica, prevalencia, transmisión, infección experimental, etc.	En desacuerdo. El enfoque que se sigue aquí se practica desde hace mucho tiempo, se utiliza en todos los capítulos sobre enfermedades de los crustáceos y la reorganización propuesta no aporta ningún valor añadido.
2.3.1. <i>Mortalidad, morbilidad y prevalencia</i>	Suprimir la declaración sobre el cuadro clínico de la IHHNV en Perú y Ecuador, ya que induce a error al sugerir que el genotipo no es virulento.	En desacuerdo. La afirmación representa con exactitud las conclusiones del estudio de referencia.
3.1. Selección de poblaciones y muestras individuales	Añadir una frase sobre los especímenes adecuados para las pruebas de detección de la infección por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa.	De acuerdo.
	Añadir "utilizando las pruebas de la Tabla 4.1." al final de la segunda frase, ya que los límites de detección dependen de las pruebas y de la estrategia de vigilancia.	En desacuerdo. El objetivo de esta sección es describir qué muestras son las mejores para demostrar el estatus libre de enfermedad; se recomiendan todas las pruebas clasificadas en la Tabla 4.1.
3.4. Muestreo no letal	Proporcionar referencias o datos sobre los parámetros de diagnóstico cuando se utilice la hemolinfa o los pleópodos tomados de muestras no letales como método de detección del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa en poblaciones aparentemente sanas.	En desacuerdo. El rendimiento diagnóstico va más allá del ámbito de aplicación de esta sección, que trata la selección del tipo de tejido. De acuerdo con incluir la siguiente frase: <u>Si se utilizan tipos de muestras no letales, deberá tenerse en cuenta el rendimiento del método de diagnóstico para un fin de uso específico.</u>

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
3.5.1. <i>Muestras para el aislamiento de patógenos</i>	Cambiar el título de "Muestras para el aislamiento de patógenos" por "Muestras para bioensayo" y suprimir la mención del aislamiento de patógenos en la primera frase, ya que la IHHNV no crece <i>in vitro</i> .	De acuerdo.
Tabla 4.1. <i>Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados</i>	Añadir un bioensayo para el diagnóstico presuntivo de peces clínicamente afectados, ya que se describe en el capítulo y es adecuado para el diagnóstico de la IHHNV.	De acuerdo. Se añadió a la tabla a tales efectos y, en consecuencia, se agregó a la Sección 6.2.1. <i>Definición de caso sospechoso en animales clínicamente afectados</i>
Table 4.4.2.1. <i>Conjunto de cebadores recomendados para la detección de la IHHNV por PCR convencional</i>	Corregir las secuencias para los cebadores directo e inverso en el método 2.	De acuerdo.
6.2.2. <i>Definición de caso confirmado en animales clínicamente afectados</i>	La histopatología debe ser uno de los métodos de diagnóstico enumerados en la Sección 6.2.2.	En desacuerdo. La histopatología por sí sola no basta para confirmar un caso positivo.

El Capítulo revisado 2.2.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética* figura en el [Anexo 24](#) y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

#### 10.1.4. Capítulo 2.2.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa*

Se recibieron comentarios de Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido y la UE.

##### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa* actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 7.1.6., página 19).

##### Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
2.1.1. <i>Agente etiológico</i>		Se dejó en claro que el virus de la mionecrosis infecciosa se asigna provisionalmente a la familia <i>Totiviridae</i> y se actualizaron las referencias correspondientes.
3.1. <i>Selección de las poblaciones y muestras individuales</i>	Añadir "utilizando las pruebas de la Tabla 4.1." al final de la segunda frase, ya que los límites de detección dependen de las pruebas y de la estrategia de vigilancia.	En desacuerdo. El objetivo de esta sección es describir qué muestras son las mejores para demostrar el estatus libre de enfermedad; se recomiendan todas las pruebas clasificadas en la Tabla 4.1.
3.4. <i>Muestreo no letal</i>	Aportar referencias o datos sobre los parámetros de diagnóstico cuando se utilice la hemolinfa o los pleópodos tomados de muestras no letales como método de cribado del virus de la mionecrosis infecciosa en poblaciones aparentemente sanas.	En desacuerdo. El rendimiento del método de diagnóstico supera el ámbito de esta sección, que trata la selección del tipo de tejido. Se añadió una declaración para considerar el impacto en el rendimiento diagnóstico.
6.1.1. <i>Definición de caso sospechoso en poblaciones aparentemente sanas</i>	Suprimir la histopatología de la definición, ya que no puede recomendarse para animales aparentemente sanos.	De acuerdo.
6.1.2. <i>Definición de caso confirmado en poblaciones aparentemente sanas</i>	Suprimir la hibridación <i>in situ</i> de la definición por no ser suficientemente específica.	De acuerdo.
6.2.2. <i>Definición de caso confirmado en animales clínicamente afectados</i>	Añadir histopatología a la definición.	En desacuerdo. No es lo suficientemente específica como para confirmar un caso positivo.

El Capítulo revisado 2.2.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa* figura en el [Anexo 25](#) y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General en mayo de 2023.

#### 10.1.5. Capítulo 2.2.7. *Infección por el virus del síndrome de Taura*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido y la UE.

##### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.7. *Infección por el virus del síndrome de Taura* actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

##### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 ítem 7.1.7., página 20).

##### Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
3.1. <i>Selección de poblaciones y muestras individuales</i>	Añadir "utilizando las pruebas de la Tabla 4.1." al final de la segunda frase, ya que los límites de detección dependen de las pruebas y de la estrategia de vigilancia.	En desacuerdo. El objetivo de esta sección es describir las mejores muestras para detectar el virus del síndrome de Taura; se recomiendan todas las pruebas clasificadas en la Tabla 4.1. Suprimir el texto que hace referencia a la certificación de ausencia de la infección por el virus del síndrome de Taura de la última frase por carecer de utilidad.
3.4. <i>Muestreo no letal</i>	Presentar referencias o datos sobre los parámetros de diagnóstico cuando se utiliza la hemolinfa o los pleópodos tomados de muestras no letales como método de detección de los virus del síndrome de Taura en poblaciones aparentemente sanas.	En desacuerdo. El rendimiento de las pruebas de diagnóstico está fuera del ámbito de aplicación de esta sección, que trata la selección del tipo de tejido. Se acordó incluir la siguiente frase: <u>Si se utilizan tipos de muestras no letales, deberá tenerse en cuenta el rendimiento de los métodos de diagnóstico para un fin de uso específico.</u>
3.5.1 <i>Muestras para el aislamiento de patógenos</i>	Sustituir el párrafo por "no disponible", ya que el cultivo celular no puede utilizarse para el aislamiento del síndrome de Taura.	Se reemplazó "aislamiento de patógenos" por "bioensayo" en el título y en el texto para que la sección abarque ahora el material para bioensayo.
4.2.1. <i>Fase aguda del síndrome de Taura</i>	Suprimir la primera frase, ya que no es pertinente para la histopatología y la citopatología.	En desacuerdo. El comentario es incorrecto - la necrosis se observa en secciones histológicas.
4.2.3. <i>Fase crónica de la infección por el síndrome de Taura</i>	Suprimir la primera frase, ya que no es pertinente para la histopatología y la citopatología.	En desacuerdo. La frase introduce el texto sobre los hallazgos histológicos.
6.1.1. <i>Definición de caso sospechoso en poblaciones aparentemente sanas</i>	Suprimir la histopatología de la definición, ya que no puede recomendarse para animales aparentemente sanos.	De acuerdo. Sin embargo, se mantuvo en la Tabla 4.1. por tratarse de un método útil para detectar la infección por el síndrome de Taura en las fases aguda y crónica de la infección.
6.1.2. <i>Definición de caso confirmado en poblaciones aparentemente sanas</i>	Suprimir la hibridación <i>in situ</i> de la definición, ya que no es suficientemente específica para confirmar un caso en esta población.	De acuerdo.
6.2.2. <i>Definición de caso confirmado en animales clínicamente afectados</i>	Añadir la histopatología a la definición.	En desacuerdo. No es lo suficientemente específica para confirmar un caso positivo.

El Capítulo revisado 2.2.7. *Infección por el virus del síndrome de Taura* figura en el **Anexo 26** y se presentará para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

---

### 10.1.6. Capítulo 2.2.8. *Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.8. *Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas* (WSSV), actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo sobre enfermedades.

La Comisión tomó nota de que las evaluaciones llevadas a cabo por el *Grupo ad hoc sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a las enfermedades de la lista de la OMSA para la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas* en junio de 2016 no habían sido aplicadas previamente por la Comisión ya que aún no se había adoptado el Artículo 1.5.9. del Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de especies en la lista como susceptibles al virus del síndrome de las manchas blancas*. La Comisión tomó nota de que el texto adoptado actualmente en la Sección 2.2.1. del Capítulo 2.2.8. del *Manual Acuático* no se revisaría hasta finalizar esta revisión.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 7.1.8., página 20).

#### Febrero de 2023

La Comisión señaló de que la literatura científica sobre la susceptibilidad de los crustáceos a la infección por el WSSV no se había vuelto a evaluar desde la última reunión del Grupo *ad hoc* sobre susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA en junio de 2016. La Comisión reconoció que la aplicación de los criterios del Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico*, puede dar lugar a especies adicionales que cumplan los criterios de susceptibilidad y repercutir en la aplicación de los criterios del Artículo 1.5.9. La Comisión destacó que el grupo *ad hoc* había sido convocado nuevamente para completar las evaluaciones de las restantes enfermedades de la lista de la OMSA al que solicitó actualizar las evaluaciones de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas para asegurarse de que la lista de especies susceptibles se basa en la literatura actual. Una vez que el grupo *ad hoc* haya terminado este trabajo, la Comisión aplicará el Artículo 1.5.9. del Capítulo 1.5. para modificar el Artículo 9.8.2. del *Código Acuático* y los Artículos 2.2.1. y 2.2.2. del *Manual Acuático*.

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
3.4. <i>Muestreo no letal</i>	Añadir una referencia a la Sección 6. <i>Criterios de diagnóstico corroborativo</i> para determinar el tamaño de la muestra al seleccionar animales de poblaciones aparentemente sanas o clínicamente afectadas.	En desacuerdo. No es necesario ni apropiado incluir aquí el tamaño de la muestra. Se deben tener en cuenta múltiples cuestiones a la hora de diseñar una encuesta, como la prevalencia esperada, la confianza, etc. Acordó incluir esta afirmación: <u>Si se utilizan tipos de muestras no letales, deberá tenerse en cuenta el rendimiento del método de diagnóstico para una finalidad específica.</u>
4.4.1. <i>PCR en tiempo real</i>	Añadir el número de acceso a GenBank y corregir los parámetros de ciclado.	De acuerdo.
6.1.2. <i>Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos</i>	Suprimir la hibridación <i>in situ</i> de la definición, ya que no es suficientemente específica para confirmar un caso en esta población.	De acuerdo. Sin embargo, se suprimió debido a la sensibilidad en esta población.
6.2.2. <i>Definición de caso confirmado en animales clínicamente afectados</i>	Añadir histopatología a la definición.	En desacuerdo. No es lo suficientemente específica para confirmar un caso positivo.

El Capítulo revisado 2.2.8. *Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas* figura en el **Anexo 27** y se presentará para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

## 10.2. Sección 2.3. Enfermedades de los peces

### 10.2.1. Capítulo 2.3.1. *Infección por Aphanomyces invadans (síndrome epizoótico ulcerante)*

Se recibieron comentarios de Australia, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido, Taipéi Chino y la UE.

#### Contexto

En su reunión de febrero de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.3.1. *Infección por Aphanomyces invadans (síndrome epizoótico ulcerante)* actualizado y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión modificó el capítulo propuesto tras considerar los comentarios de los Miembros.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 3.1.2.1., página 10) e informe de septiembre de 2022 (ítem 7.2.1., página 21).

## Reunión de febrero de 2023

Sección/ párrafo	Comentario	Decisión
2.4.6. <i>Desinfección de huevos y larvas: primera frase</i>	Suprimir el texto y sustituirlo por "No aplicable" porque los huevos y larvas de peces no se infectan por <i>A. invadans</i> .	Se modificó el texto para que se lea: "No hay protocolos publicados para la desinfección de <i>A. invadans</i> ".
4.1. <i>Observación de signos clínicos</i>	Incluir una descripción de los signos clínicos, ya que se incluye en la Tabla 4.1. como método recomendado para la vigilancia específica.	De acuerdo. Se añadió esta nueva sección y, en consecuencia, se enmendó la Sección 5. <i>Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia a fin de demostrar la ausencia de la enfermedad en poblaciones aparentemente sanas.</i>
4.4.2. <i>PCR convencional</i>	Añadir detalles de especificidad y sensibilidad de los tres cebadores PCR y protocolos para facilitar la selección del usuario.	Estos detalles se encuentran en las publicaciones y en la tabla de parámetros de los ciclos de PCR. Se añadió una frase de referencia sobre la reactividad cruzada de uno de los ensayos de PCR con <i>A. frigidophilus</i> .
4.6. <i>Hibridación in situ</i>		Se acortó la descripción del procedimiento, ya que incluía detalles innecesarios.
5. <i>Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia a fin de demostrar la ausencia en poblaciones aparentemente sanas</i>	Debe indicarse que el examen de los signos macroscópicos en las poblaciones diana es la prueba de vigilancia específica para declarar la ausencia de infección por <i>A. invadans</i> .	De acuerdo. Se reemplazó el texto existente por la declaración propuesta y añadió una referencia a la nueva Sección 4.1. <i>Observación de signos clínicos.</i>

El Capítulo revisado 2.3.1. *Infección por Aphanomyces invadans (síndrome epizoótico ulcerante)* figura en el **Anexo 28** y se presentará para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo 2023.

### 10.2.2. Capítulo 2.3.2. *Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido, Tailandia y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.3.2. *Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica* actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

En sus reuniones de febrero y septiembre de 2022, la Comisión modificó el capítulo propuesto tras considerar los comentarios de los Miembros.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2021 (ítem 6.1.3., página 31); febrero de 2022 (Parte B: ítem 3.1.2.2., página 11) y septiembre de 2022 (ítem 7.2.2., página 22).

Reunión de febrero de 2023

<b>Sección/párrafo</b>	<b>Comentario</b>	<b>Decisión</b>
2.2.1. <i>Especies hospedadoras susceptibles</i> y 2.2.2. <i>Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad</i>	Hacer referencia a cada una de las especies.	Las referencias se incluyen en el informe del Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de peces a las enfermedades de la lista de la OMSA.
2.2.3. <i>Probabilidad de infección por especie, etapa de vida del hospedador, población o subpoblaciones</i>	Suprimir "otros" en la frase, ya que no se describe la infección de los huevos o de las primeras fases de vida de ninguna especie de peces.	De acuerdo.
2.2.5. <i>Reservorios de infección en animales acuáticos</i>	Añadir una frase sobre los brotes esporádicos observados en zonas endémicas del virus de la necrosis hematopoyética epizoótica y aclarar por qué sólo se hace referencia específica a la trucha arco iris y a la perca europea.	En base a los comentarios del experto del laboratorio de referencia, se suprimió todo el texto existente y se reemplazó por "Ninguno conocido".
2.3.1. <i>Mortalidad, morbilidad y prevalencia</i>	Añadir una frase indicando que las percas europeas de distintas zonas geográficas demostraron ser susceptibles a la necrosis hematopoyética epizoótica en condiciones experimentales.	De acuerdo.
2.3.6. <i>Distribución geográfica</i>	Ampliar la frase sobre el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica en Australia incluyendo los resultados publicados sobre los brotes esporádicos que afectan a un pequeño número de percas europeas.	De acuerdo.
3.1. <i>Selección de las poblaciones y muestras individuales, apartado i)</i>	Suprimir "trucha arco iris", ya que la perca europea es mucho más susceptible al virus de la necrosis hematopoyética epizoótica.	Aclarar que se deben extraer muestras de la perca europea cuando estén disponibles; en caso contrario, se debe hacer lo mismo con la trucha arco iris o las demás especies susceptibles enumeradas en la Sección 2.2.1.
3.1., apartado ii)	Sustituir "lotes de población" por "unidades epidemiológicas".	De acuerdo.
3.1., apartado iii)	Proponer algunos cambios menores en el texto para que la frase abarque el muestreo durante los brotes de enfermedades que se producen fuera de un entorno de piscifactoría.	De acuerdo.

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
3.4. <i>Muestreo no letal</i>	Añadir una referencia que justifique la afirmación o suprimir el texto.	Reemplazar el texto por "No aplicable".
4. Métodos de diagnóstico, primer párrafo	Suprimir "vigilancia de" en el apartado i).	En desacuerdo. Los textos reflejan el título de las columnas A, B, C en la Tabla 4.1.
Tabla 4.1. <i>Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados</i>	Reducir la puntuación del cultivo celular para los tres fines, ya que puede ser apropiado para la vigilancia de animales aparentemente sanos durante/después de un brote de necrosis hematopoyética epizootica, pero no hay pruebas de que sea el caso para la vigilancia general de la enfermedad.	De acuerdo con el laboratorio de referencia. El cultivo celular se utiliza menos desde la aparición de las pruebas moleculares y es lento y laborioso.
4.3.2. <i>Cultivo celular</i>	Modificar el título por "Líneas celulares para el aislamiento del virus", ya que la sección sólo describe las líneas celulares utilizadas para incubar el virus de la necrosis hematopoyética epizootica.	De acuerdo.
	Suprimir la última frase, debido a que se refiere a la identidad de los virus en cultivo celular y es irrelevante para esta sección.	De acuerdo. La frase se trasladó a la Sección 4.3.4. <i>Interpretación de los resultados</i> .
4.4.1. <i>PCR en tiempo real, tabla de los parámetros de ciclo PCR</i>	Reinsertar las pruebas PCR en tiempo real descritas por Jaramillo <i>et al.</i> (2012) y Stilwell <i>et al.</i> (2018) basándose en el texto y las referencias originales.	De acuerdo. Se añadieron ambos métodos y los detalles correspondientes.
4.9. <i>Métodos para la detección basados en anticuerpos o antígenos</i>	Trasladar la frase sobre la prueba ELISA indirecta de la Sección 4.10. <i>Otros métodos</i> a esta Sección, por adaptarse mejor.	De acuerdo.
4.10. <i>Otros métodos</i>	Suprimir la primera frase, ya que contradice la literatura publicada.	De acuerdo.

El Capítulo revisado 2.3.2. *Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizootica* figura en el [Anexo 29](#) y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

#### 10.2.3. Sección 2.2.1. del Capítulo 2.3.9. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa*

Se recibieron comentarios de China (Rep. Pop. de), Reino Unido, Taipéi Chino y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos acordó incluir la carpa Jinsha bass (*Percocypris pingi*) en la lista de especies susceptibles de la Sección 2.2.1. del Capítulo 2.3.9. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa*.

Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 7.2.3., página 23).

Reunión de febrero de 2023

Sección/ párrafo	Comentario	Decisión
2.2.1.	En inglés, el nombre común de <i>Percocypris pingi</i> debería ser "Jingsha barbel carp", ya que el estatus taxonómico de este pez es: "Cyprinidae, Subbarbinae, Genus of barbel carp."	En la versión inglesa, "Jingsha bass carp" se cambió por "Jingsha barbel carp" (ver ítem 7.4.).
2.2.1.	Los nombres comunes de las especies susceptibles no respetan la convención utilizada en el <i>Código Acuático</i> de utilizar únicamente la mayúscula para los nombres propios.	Los nombres comunes que no empiezan por nombres propios se cambiaron a minúsculas. Los demás casos en que esto ocurra se modificarán en la versión 2023 del <i>Manual Acuático</i> .

La Sección revisada 2.2.1. del Capítulo 2.3.9. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa* figura en el **Anexo 30** y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General de mayo de 2023.

**10.3. Sección 2.4. Enfermedades de los moluscos**

**10.3.1. Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. *Infección por Bonamia exitiosa* y Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.3. *Infección por Bonamia ostreae***

Se recibieron comentarios del Reino Unido y la UE.

Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos convino en modificar los Capítulos 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. *Infección por Bonamia exitiosa* y el Capítulo 2.4.3. *Infección por Bonamia ostreae*, con respecto a la nueva nomenclatura de la ostra Suminoe y la ostra de copa del Pacífico (ver ítem 7.6.)

Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.3. *Infección por Bonamia ostreae*: Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 7.3.1., página 23).

Reunión de febrero de 2023

Capítulo/ Sección	Comentario	Decisión
-------------------	------------	----------

Capítulo 2.4.2., Sección 2.2.1. y Capítulo 2.4.3., Sección 2.2.1.	En FAOTERM, el nombre común en inglés para <i>Magallana</i> ( <i>Syn. Crassostrea</i> ) <i>ariakensis</i> se reemplazó recientemente por “ <i>Ariake cupped oyster</i> ”.	En la versión inglesa, el nombre común de <i>Magallana</i> ( <i>Syn. Crassostrea</i> ) <i>ariakensis</i> se reemplazó por “ <i>Ariake cupped oyster</i> ” (ver ítem 7.6).
--	---	---

Las Secciones revisadas 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. *Infección por Bonamia exitiosa*, y las Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.3. *Infección por Bonamia ostreae* figuran en el [Anexo 31](#) y el [Anexo 32](#), respectivamente y se propondrán para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General en mayo de 2023.

### 10.3.2. Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.4. *Infección por Marteilia refringens*

Se recibieron comentarios de los Estados Unidos de América, del Reino Unido y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos examinó el informe del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por enfermedades de la lista de la OMSA que realizó evaluaciones de las especies susceptibles a la infección por *Marteilia refringens* según los criterios presentados en el Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico*. La Comisión acordó modificar las Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.4. *Infección por Marteilia refringens*, de acuerdo con las recomendaciones del grupo *ad hoc*, excepto para el copépodo (*Paracartia grani*). La Comisión convino en añadir un nuevo párrafo en la Sección 2.2.1. para reflejar la situación única del riesgo asociado al copépodo (*Paracartia grani*) como hospedador intermediario.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (Parte B: ítem 7.3.1., página 23).

#### Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
2.2.1.	En la versión inglesa, el nombre común de la <i>Chamelea gallina</i> debe incluir la palabra "clam" al final.	En inglés, " <i>striped venus</i> " (almeja de la venus rayada) se cambió por " <i>striped venus clam</i> " (ver ítem 7.7.).

Las Secciones revisadas 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.4. *Infección por Marteilia refringens* figura en el [Anexo 33](#) y se propondrá para adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General en mayo de 2023.

## 11. Ítems para comentario de los Miembros

### 11.1. Sección 2.2. Enfermedades de los crustáceos

#### 11.1.1. Capítulo 2.2.0. *Información general: enfermedades de los crustáceos*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Reino Unido, Tailandia, y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos modificó el Capítulo 2.2.0. *Información general (enfermedades de los crustáceos)*, en consulta con los expertos del laboratorio de referencia para las enfermedades de los crustáceos.

Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 7.1.1., página 15).

Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
Comentario general sobre las referencias cruzadas de los capítulos del <i>Manual Acuático</i>	Las referencias cruzadas de los capítulos deben ser coherentes en todo el <i>Manual Acuático</i> .	De acuerdo. El estilo consiste en indicar el número de capítulo y el título completos, en cursiva, la primera vez que se mencionan; para todas las referencias posteriores dentro del capítulo se utiliza sólo el número de capítulo. Como los capítulos de información general tienen secciones diferenciadas, se aplica la misma regla, pero adaptada: la primera vez que se menciona en cada sección, el título completo; después, sólo el número de capítulo.
A.1.2. <i>Especificaciones en función de la población de los crustáceos</i>	Sustituir "lotes" por "unidades epidemiológicas".	De acuerdo.
	Aclarar los apartados i) a iv), que se refieren únicamente al muestreo de animales enfermos, mientras que el párrafo inicial de la Sección 1.2 hace referencia a diversas razones para el muestreo.	En desacuerdo. El párrafo introductorio se refiere al diseño de un sistema de vigilancia para demostrar el estatus libre de enfermedad de un país, zona o compartimento, por lo que la selección de animales enfermos sería apropiada en tales circunstancias. Modificación de la sección para alinearla con el Capítulo 2.3.0 <i>Información general (enfermedades de los peces)</i> .
A.1.3. <i>Especificaciones en función del estado clínico</i>	Añadir información sobre el muestreo de poblaciones aparentemente sanas para la ausencia de enfermedad o la vigilancia.	En desacuerdo. La propuesta ya se ha tratado en la Sección 1.2.
	Suprimir la última frase, ya que la información figura en el apartado anterior.	De acuerdo. Suprimir la última frase.
A.2.2.2. <i>Aislamiento del virus</i>	Suprimir el texto y reemplazarlo por "No procede".	De acuerdo. El nodavirus de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> puede aislarse utilizando líneas celulares de insectos o SSN-1, pero no es un método recomendado. Se incluyó una frase explicativa.

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
A.2.3. <i>Examen bacteriológico</i>	Eliminar la información específica sobre patógenos del capítulo general sobre crustáceos, en aras de coherencia con el enfoque del capítulo general sobre peces.	En desacuerdo. Se modificó el texto para aclarar que, aunque no se utiliza de forma rutinaria para las enfermedades de la lista, puede recurrirse al examen bacteriológico para algunas de ellas.
B.1.3.2. <i>Producción de virus</i>	Aclarar el texto, que afirma que la infección de especies hospedadoras susceptibles conocidas es el método preferido para la producción de virus con fines experimentales.	De acuerdo. Se añadió "con fines experimentales" al título de la sección.
B.5. <i>Técnicas</i>	Suprimir la recomendación de 50 a 150 postlarvas aptas para la puesta en común, ya que entra en conflicto con las recomendaciones de la mayoría de los capítulos específicos de enfermedad.	De acuerdo.
B.5.5. <i>Uso de técnicas moleculares y basadas en anticuerpos para pruebas de confirmación y diagnóstico</i>	Suprimir el tercer párrafo sobre los protocolos de pruebas PCR, que no se ajusta a los capítulos específicos de enfermedad, y debería reflejar el enfoque actual sobre el uso de la PCR.	En desacuerdo. El párrafo incluye información importante, que no figura en otros lugares sobre lo que puede salir mal en una prueba PCR. El párrafo también se incluye en el Capítulo 3.3.0. No está relacionado con el rendimiento diagnóstico y no entra en conflicto con los capítulos específicos de enfermedad.
B.5.5.1. <i>Preparación y tipos de muestra</i>		Añadir un nuevo apartado vi) sobre los tejidos fijados para la hibridación <i>in situ</i> , que falta. segura
5.5.3. <i>Extracción de ácido nucleico</i>	Añadir texto para indicar que debe confirmarse la idoneidad de los kits de extracción.	En desacuerdo. El tema se trata en la siguiente frase.

El Capítulo revisado 2.2.0. *Información general (enfermedades de los crustáceos)* figura en el Anexo 34 para comentario de los Miembros.

#### 11.1.2. Capítulo 2.2.2. *Infección por Aphanomyces astaci (plaga del cangrejo del río)*

Se recibieron comentarios de Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Reino Unido, Tailandia y la UE.

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.2. *Infección por Aphanomyces astaci (plaga del cangrejo de río)* actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de septiembre de 2022 (ítem 7.1.3., página 17).

Reunión de febrero de 2023

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
En todo el capítulo	Suprimir el término "altamente susceptibles" después de "especies de cangrejos de río", ya que este término es incoherente con la definición de especies susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5. del <i>Código Acuático</i> .	De acuerdo. Nueva formulación: "especies propensas al desarrollo de enfermedad clínica".
2.1.1. <i>Agentes patógenos, cepas del agente</i>	Se describen cinco grupos (A-E) de <i>A. astaci</i> , pero no se proporciona información sobre el grupo E.	De acuerdo. Se añadió una frase y una referencia sobre una especie que ha demostrado ser portadora del grupo E.
2.2.1. <i>Especies hospedadores susceptibles</i>	Mantener la lista "en estudio", ya que el Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA aún no ha finalizado el trabajo sobre esta enfermedad.	Alinear el texto con el <i>Código Acuático</i> e incluir una nota en la que se indique que la evaluación del grupo <i>ad hoc</i> aún no se ha terminado.
2.2.2. <i>Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad</i>	Mantener la lista "en estudio", ya que el Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA aún no ha terminado el trabajo sobre esta enfermedad.	De acuerdo.
2.2.3. <i>Probabilidad de infección por especie, etapa de vida del hospedador, población o subpoblaciones</i>	Suprimir el texto: la información de esta sección debe describir cualquier diferencia de infección entre especies, si procede, la predilección a la infección según la fase de vida. Si no hay información, la sección debe indicar no aplicable.	Reformular el texto para aclarar las diferencias en la manifestación clínica de la enfermedad y la mortalidad. Se añadió un nuevo texto con parte de la información suprimida de la Sección 2.2.1.
2.2.5. <i>Reservorios de infección en animales</i>	Reformular para explicar mejor la afirmación sobre "colonización de hábitats", eliminar el uso incorrecto del término "susceptibilidad" y aclarar los términos "portador", "reservorio animal" y "vector" para esta sección.	De acuerdo. Reformular el texto sobre la colonización, sustituir de "portadores" por "reservorios" y suprimir "muy susceptibles".
2.2.6. <i>Vectores</i>	Trasladar el texto a la Sección 2.3.4. <i>Modos de transmisión y ciclo de vida</i> , por considerarlo más adecuado.	De acuerdo: se añadió el texto al final de la sección como cuarto párrafo. También se desplazaron los dos primeros párrafos después del tercero.

Sección/párrafo	Comentario	Decisión
2.3.6. <i>Distribución geográfica</i>	Aclarar el texto para garantizar que la información facilitada a los Miembros esté respaldada por pruebas.	De acuerdo. Se borró el texto sobre las zonas geográficas potencialmente infectadas
2.4.2. <i>Tratamiento con sustancias químicas</i>	Simplificar el texto borrando una cláusula redundante.	De acuerdo.
2.4.3. <i>Immunoestimulación</i>	Simplificar el texto borrando una cláusula redundante.	De acuerdo.
2.4.4. <i>Selección genética a favor de la resistencia</i>	Suprimir el texto sobre la posible selección de resistencia en el cangrejo de río de Norteamérica por ser inexacto.	De acuerdo.
2.4.7. <i>Prácticas generales de manejo</i>	Suprimir todo el texto ya que la información es incoherente con otros capítulos y no es específica de la plaga del cangrejo del río.	En desacuerdo. El texto es conforme con otros capítulos y proporciona información útil.
4.4.1. <i>PCR en tiempo real, primer párrafo después de la table de los parámetros de ciclado</i>	Suprimir "lo cual equivale a menos de un genoma de <i>A. astaci</i> " ya que añade confusión a la declaración sobre el límite de detección del método.	De acuerdo.

El Capítulo revisado 2.2.2. Infección por *Aphanomyces astaci* (plaga del cangrejo del río) figura en el **Anexo 35** para comentario de los Miembros.

### 11.1.3. Capítulo 2.2.6. *Infección por el nodavirus Macrobrachium rosenbergii (enfermedad de la cola blanca)*

Reunión de febrero de 2023

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.6. *Infección por el nodavirus Macrobrachium rosenbergii (enfermedad de la cola blanca)* actualizado por el experto del laboratorio de referencia de la OMSA y un miembro de la Comisión, y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo sobre enfermedades.

Las principales modificaciones incluyen:

Sección/ párrafo	Cambio
2.1.1. <i>Agentes patógenos, cepas del agente</i>	Se actualizó la información de esta sección para distinguir claramente la descripción de los dos virus asociados a la enfermedad de la cola blanca.
2.2.3. <i>Vectores</i>	Se amplió esta sección para incluir texto y una referencia a los insectos vectores.
Tabla 4.1.	Se completó la Tabla 4.1. y se armonizó con las definiciones de caso de la Sección 6.
4.2. <i>Histopatología y citopatología</i>	Se añadió una descripción de las características histopatológicas y referencias.

Sección/ párrafo	Cambio
4.6. <i>Hibridación in situ</i>	Se añadió texto añadido y una referencia.
6. <i>Criterios de diagnóstico confirmativo</i>	Se revisaron las definiciones revisadas de caso sospechoso y confirmado en animales aparentemente sanos y clínicamente afectados.
7. <i>Referencias</i>	Se actualizaron las referencias.

El Capítulo revisado 2.2.6. *Infección por el nodavirus Macrobrachium rosenbergii (enfermedad de la cola blanca)* figura en el **Anexo 36** para comentario de los Miembros.

#### 11.1.4. Capítulo 2.2.9. *Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1*

##### Reunión de febrero de 2023

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.9. *Infección por el virus de la cabeza amarilla (genotipo 1)* actualizado por el experto del laboratorio de referencia de la OMSA y reformateado utilizando el nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

Las principales modificaciones incluyen:

Sección/párrafo	Cambio
2.1.1. <i>Agente patógeno, cepas del agente</i>	Se borró la información sobre genotipos distintos del virus de la cabeza amarilla (genotipo 1)
Tabla 4.1.	Se completó la Tabla 4.1. y se armonizó con las definiciones de caso de la Sección 6.
4.4.2. <i>PCR-TR convencional</i>	Se actualizó el texto. Dado que los métodos para detectar los genotipos víricos del complejo de la cabeza amarilla son muy complicados debido a los diferentes genotipos y a la necesidad de diferenciarlos, se describen algunas particularidades de la aplicación de los métodos que de otro modo no quedarían reflejadas en las tablas.
4.6. <i>Hibridación in situ</i>	Se simplificó la descripción de la prueba debido a la presencia de referencias.
4.8. <i>Bioensayo</i>	Se simplificó la descripción de la prueba debido a la presencia de referencias.
5. <i>Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia para demostrar la ausencia en poblaciones aparentemente sanas</i>	Se dejó claro que se recomienda la RT-PCR anidada. La Comisión es consciente de que se validó un método específico de PCR en tiempo real y está pendiente de su publicación.
6. <i>Criterios de diagnóstico confirmativo</i>	Se revisaron las definiciones de caso sospechoso y se confirmaron en animales aparentemente sanos y clínicamente afectados.
7. <i>Referencias</i>	Se actualizaron las referencias.

El Capítulo revisado 2.2.6. *Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1* figura en el **Anexo 37** para comentario.

---

## 11.2. Sección 2.4. *Enfermedades de los moluscos*

### 11.2.1. Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.5. *Infección por Perkinsus marinus*

#### Contexto

El Grupo ad hoc sobre susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por enfermedades de la lista de la OMSA se reunió en noviembre-diciembre de 2022 para proseguir su labor de aplicación de los criterios del Capítulo 1.5. *Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico*. En esta reunión, el grupo ad hoc llevó a cabo las evaluaciones de susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por *Perkinsus marinus*.

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión para los Animales Acuáticos modificó las Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.5. *Infección por P. marinus*, en consonancia con las recomendaciones del Grupo ad hoc sobre susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por enfermedades de la lista de la OMSA (ver ítem 8.5.).

Las Secciones revisadas 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.5. *Infección por Perkinsus marinus* figura en el [Anexo 38](#) para comentario de los Miembros.

## 11.3. Desarrollo de un mecanismo para acelerar el proceso de presentación a los Miembros de las actualizaciones de los métodos de diagnóstico del *Manual Acuático*

#### Contexto

En su reunión de septiembre de 2022, la Comisión identificó dos situaciones relacionadas con la difusión oportuna de toda nueva información de importancia en el marco de las pruebas de diagnóstico en el *Manual Acuático*. En primer lugar, se plantea qué se ha de hacer cuando surgen problemas sobre el funcionamiento de una prueba ya adoptada y que está incluida en el *Manual Acuático*. La Comisión convino en que, en tales circunstancias, se podía añadir una nota a pie de página con la naturaleza del problema y las correspondientes instrucciones.

En segundo lugar, se trata de la inclusión de nuevas pruebas de diagnóstico en el *Manual Acuático*. Se informó a la Comisión del trabajo de la Comisión de Normas Biológicas para elaborar un modelo de los datos de validación que se pedirían a los solicitantes que deseen incluir sus pruebas en el *Manual Terrestre*. La Comisión acordó seguir debatiendo el modelo en su reunión de febrero de 2023, en lo que respecta a su idoneidad y aplicabilidad al *Manual Acuático*.

#### Informes de la Comisión donde se discutió del tema

Informe de febrero de 2022 (ítem 3.3.1., página 16) e informe de septiembre de 2022 (ítem 8.3., página 25).

#### Reunión de febrero de 2023

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó el modelo y las enmiendas necesarias para simplificarlo y facilitar su inclusión en el *Manual Acuático*, por ejemplo, sustituir las siete finalidades previstas para una prueba de diagnóstico en el *Manual Terrestre* por las tres finalidades del *Manual Acuático*. La Comisión de Normas Biológicas decidió que el modelo se utilizara como un "informe de validación" para las pruebas recomendadas en el *Manual Terrestre*.

La Comisión para los Animales Acuáticos subrayó la importancia de validar las pruebas de diagnóstico de las enfermedades de los animales acuáticos. Aunque consideró que era preferible publicar los estudios de precisión diagnóstica en revistas revisadas por pares, en algunos casos, este formulario de

---

validación podría proporcionar un mecanismo para incorporar métodos nuevos o revisados antes de su publicación. La Comisión identificó a un experto del laboratorio de referencia de la OMSA que se encuentra en las etapas finales de desarrollo de un nuevo método PCR. Una vez los cambios introducidos, el modelo se entregará al experto y sus comentarios se revisarán en la próxima reunión.

## **12. Grupos *ad hoc***

### **12.1. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA**

El Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA se reunió en noviembre y diciembre de 2022, con el fin de evaluar la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por *Perkinsus marinus* (ver ítems 8.5. y 11.2.1.).

Se informó a la Comisión de que el grupo *ad hoc* tenía previsto volver a encontrarse en junio de 2023 para avanzar en su trabajo de evaluación de las especies susceptibles a la infección por *Perkinsus olseni*.

El informe del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por enfermedades de la lista de la OMSA puede consultarse en el sitio web de la OMSA: [Grupos ad hoc - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](https://www.woah.org/)

### **12.2. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA**

El Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA se reunió durante los meses de abril y noviembre y diciembre de 2022, con el fin de completar las evaluaciones de la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por el iridovirus de la dorada japonesa, el genogrupo del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón, el genogrupo del iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo y las especies del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (véase el punto 8.3.).

Se informó a la Comisión de que el grupo *ad hoc* tenía previsto reunirse en abril de 2023 para avanzar en su trabajo de evaluación de las especies susceptibles a la infección por el virus de la tilapia del lago.

El informe del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por enfermedades de la lista de la OMSA puede consultarse en el sitio web de la OMSA: [Grupos ad hoc - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](https://www.woah.org/)

### **12.3. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA**

Se informó a la Comisión de que el Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OMSA se volvería a reunir para aplicar los criterios del Capítulo 1.5. a las enfermedades de la lista de la OMSA, para las enfermedades incluidas en la lista desde 2016, fecha de la última reunión del grupo. El grupo *ad hoc* tiene previsto reunirse en marzo de 2023, para realizar evaluaciones de la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por el virus iridiscente de los decápodos tipo 1.

## **13. Centros de referencia de la OMSA o cambios de expertos**

### **13.1. Evaluación de las solicitudes para la designación como centro de referencia de la OMSA en temas de sanidad de los animales acuáticos o cambio de expertos**

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó una solicitud de creación de un centro colaborador de la OMSA para la economía de la sanidad animal. La Comisión quedó impresionada por esta sólida solicitud, vinculada al otro centro colaborador de la OMSA en este campo y al proyecto dirigido por la Organización sobre el Impacto Mundial de las Enfermedades Animales (GBADs). La Comisión se felicitó

---

de que los animales acuáticos fueran uno de los principales ámbitos de actividad. La Comisión respaldó plenamente la solicitud y recomendó su aceptación.

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó las solicitudes para los cambios de expertos y recomendó se aceptarán los que siguen:

*Centro Colaborador de la OMSA para la economía de la sanidad animal en la Región Américas*

Department of Agricultural Economics, Kansas State University, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Tel.: (+1-785 532.35.25)

E-mail: [dpendell@ksu.edu](mailto:dpendell@ksu.edu)

Sitio web: [www.ksu.edu](http://www.ksu.edu)

Punto de contacto designado: Dr. Dustin L. Pendell.

Este centro colaborador multinacional contará con la participación de las siguientes instituciones:

Department of Economics, Business and Sociology (ESALQ/USP), University of São Paulo, BRASIL  
Y

Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasília, BRASIL

Tel: (+55-19) 34.29.44.44 and (+55-61) 992.09.06.66

E-mail: [shgdmira@usp.br](mailto:shgdmira@usp.br) / [vitorspg@unb.br](mailto:vitorspg@unb.br)

Sitio web: [www.esalq.usp.br](http://www.esalq.usp.br) / [www.unb.br](http://www.unb.br)

Puntos de contacto designados: Dra. Sílvia Helena Galvão de Miranda / Prof. Vitor Salvador Picão Gonçalves.

Department of Business, Economics and Rural Development, Faculty of Veterinary Medicine and Husbandry, Universidad Nacional Autónoma De México, MÉXICO

Tel: (+1-52) 56.22.59.05

E-mail: [jldf@fmvz.unam.mx](mailto:jldf@fmvz.unam.mx)

Sitio web: [www.fmvz.unam.mx](http://www.fmvz.unam.mx)

Punto de contacto designado: Prof. José Luis Dávalos Flores.

School of Economic Sciences, Paul G. Allen School for Global Health, Washington State University, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Tel: (+1-509) 335.85.97

E-mail: [tl\\_marshall@wsu.edu](mailto:tl_marshall@wsu.edu)

Sitio web: [www.wsu.edu](http://www.wsu.edu)

Punto de contacto designado: Prof. Thomas L. Marsh.

## 14. Otros asuntos

### 14.1. Registro de los kits de diagnóstico

#### 14.1.1. Registro de los kits de diagnóstico de la OMSA

Se informó a la Comisión sobre posibles formas de aumentar el valor que la OMSA puede aportar a los Miembros en el ámbito de los kits de diagnóstico. Tras veinte años de existencia, y con sólo 14 kits inscritos en el registro, se llevó a cabo una consulta interna con las principales partes interesadas en este campo, internas y externas, de la que surgieron tres opciones dignas de estudio:

- Explorar los mecanismos que podrían aplicarse para facilitar la armonización reglamentaria de los kits de diagnóstico.
- Explorar el valor de establecer criterios mínimos necesarios para un registro fiable de los kits de diagnóstico, facilitando la accesibilidad a los Miembros, independientemente de su capacidad reguladora.

- 
- Simplificar los procesos de reconocimiento y la armonización de los laboratorios de referencia de la OMSA y de registro de los kits de diagnóstico de la OMSA.

Esto podría dar lugar a una secretaría renovada para el registro de kits de diagnóstico. Mientras se exploran las vías mencionadas, no se considerarán nuevos expedientes. Sólo se tramitarán los que estén actualmente curso de evaluación o las posibles renovaciones, así como los casos excepcionales relacionados con una situación de emergencia para la sanidad animal.

#### **14.1.2. Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit**

Se informó a la Comisión para los Animales Acuáticos de que se había completado la evaluación del nuevo expediente para el kit de prueba rápida "Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit". Tras examinar el informe final del grupo de expertos de la OMSA, la Comisión respaldó la recomendación del grupo de aprobar la inclusión del kit en el Registro de kits de diagnóstico de la OMSA, validado como apto para su finalidad (kit de detección cualitativa de la infección por *Whispovirus*, virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV) en camarones). Este dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral está diseñado para los siguientes fines:

- Diagnóstico de confirmación en el terreno de casos clínicos (incluye la confirmación de casos sospechosos y una prueba de detección positiva).
- Estimación de la prevalencia de la infección para facilitar el análisis de riesgos en granjas de camarones de sistemas de producción para ayudar en las prácticas de gestión. **IMPORTANTE:** el kit de pruebas no debe utilizarse para estimar la prevalencia en camarones reproductores o postlarvarios para el análisis de riesgos antes de la translocación a otras granjas o a través de las fronteras.
- Uso en combinación con otras pruebas o procedimientos diagnósticos, como ayuda en el diagnóstico u otras evaluaciones clínicas o epidemiológicas.

El resumen de los estudios de validación elaborado por el fabricante y aprobado por el panel de expertos fue aprobado por la Comisión y figura en el [Anexo 39](#).

La inscripción del "Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit (Innocreate Bioscience Co., Ltd)" al Registro de la OMSA de los kits de diagnóstico validados como aptos para su finalidad, se propondrá para su adopción en la 90.<sup>a</sup> Sesión General en mayo de 2023.

---

.../Anexos

---

## Anexo 1. Ítem 2 – Orden del día aprobado

### REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

Formato híbrido, 19 de enero y 15 al 22 de febrero de 2023

1. Bienvenida de la directora general adjunta de la OMSA
2. Aprobación del orden del día
3. Reunión con la directora general
4. Cooperación con la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres
  - 4.1. Actualización del Capítulo revisado 6.10. del *Código Terrestre*
  - 4.2. Actualización del Grupo *ad hoc* sobre la revisión de los Capítulos 5.4. a 5.7. del *Código Terrestre*
  - 4.3. Definiciones del Glosario: “servicios de sanidad de los animales acuáticos”, “autoridad veterinaria” y “autoridad competente”
  - 4.4. “Autoridad Veterinaria”
  - 4.5. Capítulo 4.3. *Aplicación de la compartimentación*
5. Cooperación con la Comisión de Normas Biológicas
  - 5.1. Centros de referencia: debate sobre los modelos de informe anual y la utilización de los datos colectados
  - 5.2. *Manuales Acuático y Terrestre*: áreas de interés común
    - 5.2.1. Tabla de la Comisión para los Animales Acuáticos sobre los parámetros de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para consideración de la Comisión de Normas Biológicas
    - 5.2.2. Actualización del capítulo sobre la validación
    - 5.2.3. Nueva sección en los capítulos específicos de enfermedad para describir la justificación subyacente en la selección de pruebas para los distintos propósitos indicados en la Tabla 1. *Métodos analíticos disponibles y su propósito y una explicación de su puntuación*
    - 5.2.4. Desarrollo de un modelo para los informes de validación para las pruebas en el *Manual Terrestre*
  - 5.3. Trabajo sobre la lista de los reactivos de referencia aprobados por la OMSA
6. Plan de trabajo y prioridades
7. Estrategia de la OMSA sobre la sanidad de los animales acuáticos
8. *Código Acuático*
  - 8.1. Textos que se propondrán para adopción en mayo de 2023
    - 8.1.1. Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)*
    - 8.1.2. Artículos 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)*
    - 8.1.3. Artículo 9.5.2 del Capítulo 9.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa*

- 
- 8.1.4. Artículo 10.9.2. del Capítulo 10.9. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa*
  - 8.1.5.7.5. Nuevo Capítulo 10.X. *Infección por el virus de la tilapia del lago*
  - 8.1.6. Artículo 11.2.2. del Capítulo 11.2. *Infección por Bonamia exitiosa*
  - 8.1.7. Artículo 11.3.2. del Capítulo 11.3. *Infección por Bonamia ostreae*
  - 8.1.8. Artículos 11.4.1. y 11.4.2. del Capítulo 11.4. *Infección por Marteilia refringens*
  - 8.1.9. Modelo de Artículos 11.X.9. - 11.X.14. para los capítulos específicos de las enfermedades de los moluscos

## 8.2. Ítems para comentario de los Miembros

- 8.2.1. Cambio de OIE por OMSA en el *Código Acuático*
- 8.2.2. Definiciones del Glosario: “servicios de sanidad de los animales acuáticos”, “autoridad veterinaria” y “autoridad competente”
- 8.2.3. Artículo 1.1.5. del Capítulo 1.1. *Notificación de las enfermedades y aportación de datos epidemiológico*
- 8.2.4. Artículo 1.3.1. del Capítulo 1.3. *Enfermedades de la lista de la OMSA*
  - 8.2.4.1. Infección por todos los genogrupos de las especies de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón
- 8.2.5. Capítulo 4.3. Aplicación de la compartimentación
- 8.2.6. Nuevo Capítulo 4.X. *Preparación de emergencia frente a las enfermedades*
- 8.2.7. Nuevo Capítulo 4.Y. *Gestión de los brotes de enfermedades*
- 8.2.8. Nuevo Capítulo 5.X. *Animales acuáticos ornamentales*
- 8.2.9. Nuevo Capítulo 5.Y. *Comercio de materiales genéticos*
- 8.2.10. Mercancías seguras – Artículos X.X.3. para los capítulos específicos de enfermedad
  - 8.2.10.1. Informe del asesor experto
  - 8.2.10.2. Artículos revisados 8.X.3. para los capítulos específicos de las enfermedades de los anfibios
  - 8.2.10.3. Artículos revisados 9.X.3. para los capítulos específicos de los crustáceos
  - 8.2.10.4. Artículos revisados 10.X.3. para los capítulos específicos de los peces
  - 8.2.10.5. Artículos revisados 11.X.3. para los capítulos específicos de los moluscos
- 8.2.11. Modelo de Artículos X.X.4.-X.X.8.
- 8.2.12. Evaluación de los periodos por defecto en los Artículos X.X.4.-X.X.8. para los capítulos específicos de enfermedad
- 8.2.13. Artículo 9.8.2. del Capítulo 9.8. *Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas*
- 8.2.14. Artículos 11.5.1. y 11.5.2. del Capítulo 11.5. *Infección por Perkinsus marinus*
- 8.2.15. Enfermedades emergentes
  - 8.2.15.1. Infección por el virus del edema de la carpa
  - 8.2.15.2. Infección por el nodavirus de la mortalidad encubierta
- 8.2.16. Consultas sobre la estrategia de la sanidad de los animales silvestres

## 9. *Manual Acuático*

---

9.1. Textos propuestos para adopción en mayo de 2023

9.1.1. Sección 2.2. *Enfermedad de los crustáceos*

9.1.1.1. Capítulo 2.2.1. *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda*

9.1.1.2. 10.1.2. Capítulo 2.2.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)*

9.1.2. Capítulo 2.2.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)*

9.1.3. Sección 2.3. *Enfermedades de los peces*

9.1.3.1. Capítulo 2.3.1. *Infección por Aphanomyces invadans (síndrome epizoótico ulcerante)*

9.1.3.2. 10.2.2. Capítulo 2.3.2. *Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica*

9.1.3.3. *Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa*

9.1.4. Sección 2.4. *Enfermedades de los moluscos*

9.1.4.1. Sección 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. *Infección por Bonamia exitiosa*

9.1.4.2. Sección 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.3. *Infección por Bonamia ostreae*

9.1.4.3. Sección 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.4. *Infección por Marteilia refringens*

9.2. Ítems para comentario de los Miembros

9.2.1. Cambio de "OIE" por "OMSA" en el *Manual Acuático*

9.2.2. Capítulo 1.1.2. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosas*

9.2.3. Sección 2.2. *Enfermedades de los crustáceos*

9.2.3.1. Capítulo 2.2.0. *Información general: enfermedades de los crustáceos*

9.2.3.2. Capítulo 2.2.2. *Infección por Aphanomyces astaci (plaga del cangrejo del río)*

9.2.3.3. Capítulo 2.2.5. *Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa*

9.2.3.4. Capítulo 2.2.6. *Infección por el nodavirus Macrobrachium rosenbergii (enfermedad de la cola blanca)*

9.2.3.5. Capítulo 2.2.7. *Infección por el virus del síndrome de Taura*

9.2.3.6. Capítulo 2.2.8. *Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas*

9.2.3.7. Capítulo 2.2.9. *Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1*

9.2.4. Sección 2.4. *Enfermedades de los moluscos*

9.2.4.1. Sección 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.5. *Infección por Perkinsus marinus*

9.2.5. Desarrollo de un mecanismo para acelerar el proceso de presentación a los Miembros de las actualizaciones de los métodos de diagnóstico del *Manual Acuático*

10. Grupos *ad hoc*

10.1. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA

10.2. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA

- 
- 10.3. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OMSA
  11. Centros de referencia de la OMSA o cambios de expertos
    - 11.1. Evaluación de las solicitudes para la designación como centro de referencia de la OMSA en temas de sanidad de los animales acuáticos o cambio de expertos
  12. Otros asuntos
    - 12.1. Para debate
      - 12.1.1. Registro de los kits de diagnóstico
      - 12.1.2. Autodeclaración de ausencia de enfermedad
      - 12.1.3. Informes de la Comisión – presentar anexos separados al texto del informe.
    - 12.2. Para información
      - 12.2.1. Organización sobre el Impacto Mundial de las Enfermedades Animales (GBADs) – presentación proyectos para los animales acuáticos
  13. Análisis de la reunión
  14. Próxima reunión: 13-20 de septiembre de 2023

---

## Anexo 2. Ítem 2 – Lista de participantes

### REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

Formato híbrido, 19 de enero y 15 al 22 de febrero de 2023

---

#### MIEMBROS DE LA COMISIÓN

---

**Dr. Ingo Ernst**  
(Presidente)  
Director Aquatic Pest and Health  
Policy,  
Animal Division  
Department of Agriculture, Fisheries  
and Forestry,  
Canberra,  
AUSTRALIA

**Dra. Alicia Gallardo Lagno**  
(Vicepresidenta)  
Senior advisor FARMAVET,  
University of Chile,  
La Pintana,  
CHILE

**Dr. Prof. Hong Liu**  
(Miembro)  
Deputy Director,  
Animal and Plant Inspection and  
Quarantine Technical Centre,  
Shenzhen Customs District  
General Administration of  
Customs  
Shenzhen City,  
CHINA (Rep. Pop. de)

**Dra. Fiona Geoghegan**  
(Vicepresidenta)  
Legislative Officer,  
European Commission,  
DG SANTE  
Brussels,  
BÉLGICA

**Dr. Kevin William Christison**  
(Miembro)  
Specialist Scientist,  
Directorate: Aquaculture Research  
and Development  
Department of Forestry, Fisheries  
and the Environment,  
Vlaeberg,  
SUDÁFRICA

**Dr. Espen Rimstad**  
(Miembro)  
Professor in Virology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Paraclinical  
Sciences (PARAFAG)  
Norwegian University of Life  
Sciences  
Ås,  
NORUEGA

#### OTROS PARTICIPANTES

---

**Dr. Mark Crane**  
CSIRO Honorary Fellow,  
Research Group Leader | AAHL Fish  
Diseases Laboratory  
Australian Centre for Disease  
Preparedness (ACDP) | CSIRO,  
Geelong,  
AUSTRALIA

**Prof. Edmund Peeler**  
Epidemiologist  
Aquatic Pests and Pathogens,  
Barrack Road, Weymouth  
Dorset, DT4 8UB  
REINO UNIDO  
Tel.: +44 (0)1305 206746  
ed.peeler@cefias.co.uk

#### SEDE DE LA OMSA

---

**Dra. Gillian Mylrea**  
Jefa del Departamento de Normas

**Dra. Kathleen Frisch**  
Coordinadora Científica para la  
Sanidad de los Animales  
Acuáticos  
Departamento de Normas

**Sra. Sara Linnane**  
Redacción científica – Normas  
Internacionales  
Departamento Científico

**Dra. Bernita Giffin**  
Coordinadora Científica para la  
Sanidad de los Animales Acuáticos  
Departamento de Normas

**Dra. Gounalan Pavade**  
Coordinador científico  
Departamento Científico

Anexo 3. Ítem 5. – Plan de trabajo y prioridades

PLAN DE TRABAJO DE LA COMISIÓN PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

(incluyendo plazos provisionales para comentario y adopción)

<i>Código Acuático</i>					
Capítulo/Tema	Situación				
	Febrero de 2023	SG mayo de 2023	Septiembre de 2023	Febrero de 2024	SG mayo de 2023
<b>Seguimiento de enfermedades emergentes y consideración de las acciones requeridas</b>	En curso				
<b>Definiciones del Glosario: “autoridad competente”, “autoridad veterinaria” y “servicios de sanidad de los animales acuáticos”</b>	Revisión del uso en el <i>Código Acuático</i> y presentación de enmiendas para comentario		Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Propuesta para adopción
<b>Capítulo 1.3. Enfermedades de la lista de la OMSA – Inclusión de la infección por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)		Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Revisión de los comentarios (3.a ronda)	Propuesta para adopción
<b>Procedimiento operativo estándar para la autodeclaración de ausencia de enfermedad</b>	Redacción de un modelo para orientar a los Miembros en la presentación de autodeclaraciones	Publicación en el sitio web de la OMSA antes de la Sesión General			
<b>Artículo 1.1.5. del Capítulo 1.1. Notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos</b>	Revisión y modificación del Artículo 1.1.5 y presentación para comentarios		Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Propuesta para adopción

<b>Código Acuático</b>					
<b>Capítulo/Tema</b>	<b>Situación</b>				
	<b>Febrero de 2023</b>	<b>SG mayo de 2023</b>	<b>Septiembre de 2023</b>	<b>Febrero de 2024</b>	<b>SG mayo de 2023</b>
<b>Capítulo 4.3. Aplicación de la compartimentación</b>	Revisión de las repuestas de los Miembros al cuestionario e inicio del trabajo en el documento de discusión		Presentación del documento de discusión para comentario	Revisión de las respuestas del documento de discusión	
<b>Capítulo 4.X. Nuevo proyecto de capítulo sobre preparación de emergencia frente a las enfermedades</b>	Continuación del trabajo en el proyecto de Capítulo 4.X.		Presentación del proyecto de Capítulo para comentario	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Capítulo 4.Y. Nuevo proyecto de capítulo sobre gestión de los brotes de enfermedad</b>	Continuación del trabajo en el proyecto de Capítulo 4.Y.		Presentación del proyecto de Capítulo para comentario	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Capítulos 5.6. – 5.9.</b>	Informe revisado del grupo <i>ad hoc</i> de la Comisión del Código		Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> de la Comisión del Código		
<b>Capítulo 5.X. Comercio de animales acuáticos ornamentales</b>	Revisión de la estructura propuesta para el Capítulo		Presentación del proyecto de Capítulo para comentario	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Capítulo 5.Y. Comercio de materiales genéticos</b>	Revisión de la estructura propuesta para el Capítulo		Presentación del proyecto de Capítulo para comentario	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Capítulo 6.2. Principios para el uso responsable y prudente de los agentes antimicrobianos en los animales acuáticos</b>	Actualización recibida de la Comisión del Código sobre la revisión del Capítulo 6.10. del <i>Código Terrestre</i>		Actualización de la Comisión del Código sobre la revisión del Capítulo 6.10. del <i>Código Terrestre</i>	Actualización de la Comisión del Código sobre la revisión del Capítulo 6.10. del <i>Código Terrestre</i>	
<b>Especies susceptibles</b>  <b>Evaluación de nuevas especies/evidencia para enfermedades evaluadas, según sea necesario</b>	En curso				

<b>Código Acuático</b>					
<b>Capítulo/Tema</b>	<b>Situación</b>				
	<b>Febrero de 2023</b>	<b>SG mayo de 2023</b>	<b>Septiembre de 2023</b>	<b>Febrero de 2024</b>	<b>SG mayo de 2023</b>
<b>Mercancías seguras – capítulos específicos de enfermedad –</b> <b>Artículos 8.X.3.– Anfibios</b> <b>Artículos 9.X.3.– Crustáceos</b> <b>Artículos 10.X.3.– Peces</b> <b>Artículos 10.X.3.– Moluscos</b>	Anfibios: Comentarios de los Miembros revisados (1.a ronda), artículos modificados en función de la evaluación de las mercancías seguras		Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Revisión de los comentarios (3.a ronda)	Presentación para adopción
	Crustáceos: artículos modificados a partir de la evaluación de las mercancías seguras y presentación para comentario de los Miembros		Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Presentación para adopción
	Peces: artículos modificados a partir de la evaluación de las mercancías seguras y presentación para comentario de los Miembros		Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Presentación para adopción
	Moluscos: Comentarios de los Miembros revisados (1.a ronda), artículos modificados en función de la evaluación de las mercancías seguras		Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Revisión de los comentarios (3.a ronda)	Presentación para adopción

**Código Acuático**

Capítulo/Tema	Situación				
	Febrero de 2023	SG mayo de 2023	Septiembre de 2023	Febrero de 2024	SG mayo de 2023
<b>Evaluación de los periodos por defecto de los Artículos X.X.4.-X.X.8. para los capítulos específicos de enfermedad</b>			Presentación de las evaluaciones de los periodos por defecto para comentario	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Especies susceptibles – Enfermedades de los crustáceos–Artículos 9.X.1. y 9.X.2. para:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Infección por el virus iridescente de los decápodos</li> <li>– Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas</li> <li>– Infección por <i>Aphanomyces astaci</i> (Plaga del cangrejo de río)</li> <li>– revisión de nueva evidencia para enfermedades previamente evaluadas</li> </ul>	Nueva reunión del grupo <i>ad hoc</i> en marzo de 2023		Infección por DIV1: Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y presentación de artículos modificados para comentario	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Presentación para adopción
					Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas: revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y presentación de los artículos modificados para comentario
<b>Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. Infección por <i>Hepatobacter penaei</i> (hepatopancreatitis necrotizante)</b>	Comentarios revisados (2.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Artículos 9.4.1. and 9.4.2. del Capítulo 9.4. Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosas (IHHNV)</b>	Comentarios revisados (2.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Artículo 9.5.2. del Capítulo 9.5. Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV)</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Especies susceptibles – Enfermedades de los</b>	Infección por RSIV: informe				

Código Acuático					
Capítulo/Tema	Situación				
	Febrero de 2023	SG mayo de 2023	Septiembre de 2023	Febrero de 2024	SG mayo de 2023
<p>peces – Artículos 10.X.1. y 10.X.2. para</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Infección por el iridovirus de la dorada japonesa</li> <li>– Infección por el virus de la tilapia del lago</li> <li>– Infección por <i>Aphanomyces invadans</i> (síndrome ulcerante epizoótico)</li> </ul>	del grupo <i>ad hoc</i> revisado				
	Infección por TiLV: Próxima reunión del grupo <i>ad hoc</i> prevista en abril de 2023		Infección por TiLV: Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y presentación de los artículos modificados para comentario	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Propuesta para adopción
				Infección por el síndrome ulcerante epizoótico: revisión del informe provisional del grupo <i>ad hoc</i>	
Artículos 10.9.2. del Capítulo 10.9. Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
Capítulo 10.X. Infección por el virus de la tilapia del lago	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<p>Especies susceptibles – Enfermedades de los moluscos – Artículos 11.X.1. y 11.X.2. para:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Infección por <i>Marteilia refringens</i></li> <li>– Infección por <i>Perkinsus marinus</i></li> <li>– Infección por <i>Perkinsus olseni</i></li> <li>– Infección por <i>Xenohaliotis californiensis</i></li> </ul>	<i>Marteilia refringens</i> : comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
	<i>Perkinsus marinus</i> : Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y presentación de los artículos modificados para comentario		Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Propuesta para adopción
			<i>Perkinsus olseni</i> : Revisión del informe	<i>Perkinsus olseni</i> : Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y presentación	

<b>Código Acuático</b>					
<b>Capítulo/Tema</b>	<b>Situación</b>				
	<b>Febrero de 2023</b>	<b>SG mayo de 2023</b>	<b>Septiembre de 2023</b>	<b>Febrero de 2024</b>	<b>SG mayo de 2023</b>
			provisional del grupo ad hoc	de los artículos modificados para comentario	
<b>Especies susceptibles – Artículos 11.2.2. del Capítulo 11.2. Infección por <i>Bonamia exitiosa</i></b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Especies susceptibles – Artículos 11.3.2. del Capítulo 11.3. Infección por <i>Bonamia ostreae</i></b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Modelo de Artículos 11.X.9.-11.X.12.: armonización con otros capítulos específicos de enfermedad</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			

<b>Manual Acuático</b>					
<b>Capítulo/Tema</b>	<b>Situación</b>				
	<b>Febrero de 2023</b>	<b>SG mayo de 2023</b>	<b>Septiembre de 2023</b>	<b>Febrero de 2024</b>	<b>SG mayo de 2023</b>
<b>Capítulo 2.2.0. Disposiciones generales – Crustáceos s</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)		Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Revisión de los comentarios (3.a ronda)	Propuesta para adopción
<b>Capítulo 2.2.1. Enfermedad de la necrosis pancreática aguda</b>	Comentarios revisados (2.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.2.2. Infección por <i>Aphanomyces astaci</i> (plaga del cangrejo de río)</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)		Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Revisión de los comentarios (3.a ronda)	Propuesta para adopción
<b>Capítulo 2.2.3. Infección por <i>Hepatobacter penaei</i> (hepatopancreatitis necrotizante)</b>	Comentarios revisados (2.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.2.4. Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y</b>	Comentarios revisados (2.a ronda)	Propuesta para adopción			

**Manual Acuático**

Capítulo/Tema	Situación				
	Febrero de 2023	SG mayo de 2023	Septiembre de 2023	Febrero de 2024	SG mayo de 2023
hematopoyética infecciosa					
<b>Capítulo 2.2.5. Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.2.6. Infección por <i>Macrobrachium rosenbergii nodavirus</i> (enfermedad de la cola blanca)</b>	Proyecto revisado y actualizado, presentación para comentario		Revisión de los comentarios (1.a ronda)	Revisión de los comentarios (2.a ronda)	Propuesta para adopción
<b>Capítulo 2.2.7. Infección por el virus del síndrome de Taura</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.2.8. Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.2.X. Infección el virus iridiscente de los decápodos tipo 1</b>			Revisión del capítulo actualizado y presentación para comentarios	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Capítulo 2.3.1. Infección por <i>Aphanomyces invadans</i> (síndrome ulcerante epizoótico)</b>	Comentarios revisados (2.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.3.2. Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica</b>	Comentarios revisados (3.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Sección 2.2.2. del Capítulo 2.3.9. Infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa</b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.3.X. Infección por el virus de la tilapia del lago</b>			Revisión del capítulo actualizado y presentación para comentarios	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	

**Manual Acuático**

Capítulo/Tema	Situación				
	Febrero de 2023	SG mayo de 2023	Septiembre de 2023	Febrero de 2024	SG mayo de 2023
<b>Capítulo 2.4.0. Información general</b>			Revisión del capítulo actualizado y presentación para comentarios	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Capítulo 2.4.1. Infección por abalone herpes virus</b>			Revisión del capítulo actualizado y presentación para comentarios	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Secciones 2.2.1. y 2.2.2. del Capítulo 2.4.4. Infección por <i>Marteilia refringens</i></b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Sección 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. Infección por <i>Bonamia exitiosa</i></b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.4.3. Infección por <i>Bonamia ostreae</i></b>			Revisión del capítulo actualizado y presentación para comentarios	Revisión de los comentarios (1.a ronda)	
<b>Sección 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. Infección por <i>Bonamia ostreae</i></b>	Comentarios revisados (1.a ronda)	Propuesta para adopción			
<b>Capítulo 2.4.7. Infección por <i>Xenohalictis californiensis</i></b>			Revisión del capítulo actualizado y presentación para comentarios		

---

Anexo 4. Ítem 7.1. – Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. Infección por *Hepatobacter Penaei*  
(hepatopancreatitis necrotizante)

CAPÍTULO 9.3.

INFECCIÓN POR *HEPATOBACTER PENA EI*  
(HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE)

Artículo 9.3.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por *Hepatobacter penaei* (hepatopancreatitis necrotizante) designa una *infección* causada por el agente patógeno *Candidatus ~~Hepatobacter penaei~~ Hepatobacter penaei*, una bacteria intracelular obligada de la familia Holosporaceae de la orden Rickettsiales de las proteobacterias alfa. La *enfermedad* se conoce comúnmente como hepatopancreatitis necrotizante.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

[...]

---

---

**Anexo 5. Ítem 7.2. – Artículos 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa**

CAPÍTULO 9.4.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA NECROSIS  
HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA

Artículo 9.4.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa es la *infección* causada por el *agente patógeno* de los decápodos penstylhamaparvovirus 1 del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa del género Penstylidensovirus Penstylhamaparvovirus y de la familia de los Parvoviridos.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 9.4.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies que cumplen con los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5.: camarón azul (*Penaeus stylirostris*), camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón blanco del Golfo (*Penaeus setiferus*), camarón patiamarillo (*Penaeus californiensis*), ~~camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*)~~, ~~camarón blanco norteño (*Penaeus setiferus*)~~, ~~camarón azul (*Penaeus stylirostris*)~~ y ~~camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*)~~ y camarón patiamarillo (*Penaeus californiensis*).

[...]

---

CAPÍTULO 9.5.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA MIONECROSIS INFECCIOSA

[...]

Artículo 9.5.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies que cumplen con los criterios de inclusión en la lista de *especies susceptibles* de acuerdo con el Capítulo 1.5.: ~~camarón tigre marrón (*Penaeus esculentus*)~~, camarón banana (*Penaeus merguensis*), langostino tigre marrón (*Penaeus esculentus*) y camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*).

[...]

---

CAPÍTULO 10.9.  
INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA VIREMIA  
PRIMAVERAL DE LA CARPA

[...]

Artículo 10.9.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies que cumplen con los criterios de inclusión en la lista de *especies susceptibles* de acuerdo con el Capítulo 1.5.:

Familia	Nombre científico	Nombre común
Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Bbrema
	<i>Aristichthys nobilis</i>	Ccarpa cabezona
	<i>Carassius auratus</i>	Ccarpa dorada
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Ccarpa herbívora
	<i>Cyprinus carpio</i>	Ccarpa común (todas las variedades y subespecies)
	<i>Danio rerio</i>	Ppez zebra
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Ccarpita dorada
	<i>Pimephales promelas</i>	Ppiscardo
	<i>Percocypris pingi</i>	[Jinsha barbel carp] Carpa de Jinsha
	<i>Rutilus kutum</i>	Ppescado blanco del Caspio
	<i>Rutilus rutilus</i>	Rrutilo
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Ssirulo

[...]

---

## Anexo 8. Ítem 7.5. – Capítulo 10.X. Infección por TiLV

### CAPÍTULO 10.X.

## INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO

#### Artículo 10.X.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por el virus de la tilapia del lago (TiLV) designa una *infección* causada por el *agente patógeno* *Tilapia tilapinevirus* del género *Tilapinevirus* y de la familia *Amnoonviridae*.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

#### Artículo 10.X.2.

##### Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies que cumplen con los criterios de inclusión en la lista de *especies susceptibles* de acuerdo con el Capítulo 1.5.: [tilapia azul (*Oreochromis aureus*), tilapia roja híbrida de Malasia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*), (*Sarotherodon galilaeus*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), (*Tilapia zilli*), (*Barbonymus schwanenfeldii*), (*Tristramella simonis*) y tilapia azul del Nilo, híbrido (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*)] (en estudio).

#### Artículo 10.X.3.

Medidas para la importación o tránsito de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por TiLV

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el TiLV, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto a la infección por TiLV:

- 1) ~~{~~*productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 560°C durante por lo menos ~~cinco~~ 120 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiva TiLV;
- 2) *harina* de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 560°C durante por lo menos ~~cinco~~ 120 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiva TiLV} ~~(en estudio)~~;
- 3) aceite de pescado;
- 4) cueros elaborados con piel de pescado.

#### Artículo 10.X.4.

##### Requisitos para una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV

Un País Miembro podrá hacer una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV en todo el país, una *zona* o un *compartimento* con arreglo a las disposiciones de los Artículos 10.X.5. a 10.X.8., según proceda. La autodeclaración de ausencia de enfermedad también debe satisfacer otros requisitos pertinentes contemplados en el *Código Acuático*, entre ellos, la exigencia de que el País Miembro reúna las siguientes condiciones:

- 
- 1) cumple las disposiciones del Capítulo 3.1.; y
  - 2) utiliza métodos de *diagnóstico* apropiados, según las recomendaciones del *Manual Acuático*; y
  - 3) satisface todos los requisitos del Capítulo 1.4. pertinentes para la autodeclaración.

#### Artículo 10.X.5.

##### País libre de infección por TiLV

Si el país comparte cuerpos de agua con otros países, solo podrá hacer una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV si todos los cuerpos de agua compartidos están situados en países o *zonas* declarados libres de infección por TiLV.

Como se describe en el Artículo 1.4.4., un País Miembro puede hacer una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV en la totalidad de su *territorio* si puede demostrar que:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 10.X.2. está presente y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante al menos los últimos [seis] meses;
- O
- 2) no ha ocurrido ninguna infección por TiLV durante al menos los [diez] últimos años, y:
  - a) el País Miembro puede demostrar que las condiciones son propicias para la manifestación clínica de la infección por ~~TiLV~~ TiLV, de acuerdo con lo descrito en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*; y
  - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* descritas en el Capítulo 1.4. durante al menos los [diez] últimos años;
- O
- 3) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante al menos los [dos] últimos años sin que se haya detectado la presencia de TiLV, y se han reunido e implementado ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante al menos [un] año antes del inicio de la *vigilancia específica*;
- O
- 4) había hecho previamente una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV y perdió posteriormente su estatus libre por haberse detectado TiLV, pero se han cumplido las condiciones siguientes:
  - a) nada más haberse detectado TiLV, el área afectada ha sido declarada *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*; y
  - b) las poblaciones infectadas dentro de la *zona infectada* se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo la probabilidad de una mayor transmisión de TiLV, y se han completado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.4.), seguidos de un periodo de *vacío sanitario* según se describe en el Capítulo 4.7.; y
  - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han mantenido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por TiLV; y
  - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante:
    - i) por lo menos los [dos] últimos años en las *especies susceptibles* silvestres y de cría sin que se haya detectado la presencia de TiLV, o
    - ii) por lo menos el [un] último año sin que se haya detectado la presencia de TiLV, si los *establecimientos de acuicultura* afectados no tenían vínculos epidemiológicos con las poblaciones silvestres de *especies susceptibles*.

---

Mientras tanto, la parte del país ubicada fuera de la zona infectada y de las zonas de protección una parte o la totalidad del país, excepto las zonas infectadas y de protección, podrá ser declarada zona libre de conformidad con el Artículo 1.4.4., siempre que se hayan cumplido reúna las condiciones descritas en el las disposiciones de los apartados 4 a) a 4 c) 2 del Artículo 10.X.6.

#### Artículo 10.X.6.

##### Zona libre de infección por ~~TiLV~~ TiLV

Si una zona se extiende por el territorio de más un país, solo podrá ser declarada zona libre de infección por TiLV si todas las autoridades competentes confirman que se han reunido el conjunto de condiciones exigidas.

Como se describe en el Artículo 1.4.4., un País Miembro puede hacer una autodeclaración de ausencia de infección por ~~TiLV~~ TiLV para una zona dentro de su territorio si puede demostrar que:

- 1) ninguna especie susceptible de las mencionadas en el Artículo 10.X.2. está presente y se han reunido ininterrumpidamente las condiciones elementales de bioseguridad durante al menos los [seis] últimos meses;  
O
- 2) no ha ocurrido ninguna infección por TiLV durante al menos los [diez] últimos años, y:
  - a) el País Miembro puede demostrar que las condiciones son propicias para la manifestación clínica de la infección por TiLV, de acuerdo con lo descrito en el Artículo 1.4.8. del Capítulo 1.4.; y
  - b) se han reunido ininterrumpidamente las condiciones elementales de bioseguridad descritas en el Capítulo 1.4. durante al menos los [diez] últimos años;  
O
- 3) se ha aplicado una vigilancia específica en la zona, de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante al menos los [dos] últimos años sin que se haya detectado la presencia de TiLV, y se han reunido ininterrumpidamente e implementado las condiciones elementales de bioseguridad durante al menos [un] año antes del inicio de la *vigilancia específica*;  
O
- 4) había hecho previamente una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV para una zona y perdió posteriormente su estatus libre por haberse detectado TiLV en la zona, pero se han cumplido las condiciones siguientes:
  - a) nada más haberse detectado TiLV, el área afectada fue declarada *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*; y
  - b) las poblaciones infectadas dentro de la *zona infectada* se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo la probabilidad de una mayor transmisión de TiLV, y se han completado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.4.), seguidos de un periodo de *vacío sanitario* según se describe en el Capítulo 4.7.; y
  - c) las condiciones elementales de bioseguridad vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han mantenido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por TiLV ; y
  - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante al menos los [dos] últimos años sin que se haya detectado la presencia de TiLV.

Mientras tanto, una parte de la zona ubicada fuera de la zona infectada y de la zona de protección podrá ser declarada nueva zona libre de conformidad con el Artículo 1.4.4., siempre que se hayan cumplido las disposiciones de los apartados 4 a) a 4 c).

#### Artículo 10.X.7.

##### Compartimento libre de infección por ~~TiLV~~ TiLV

---

Según se describe en el Artículo 1.4.4., un País Miembro podrá hacer una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV en un *compartimento* dentro de su *territorio* si puede demostrar que:

1) se ha aplicado una *vigilancia específica* en el *compartimento*, de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante al menos el [un] último año sin que se haya detectado TiLV, y se han reunido ininterrumpidamente e implementado las condiciones elementales de bioseguridad durante al menos [un] año antes del inicio de la *vigilancia específica*;

O

2) había hecho previamente una autodeclaración de ausencia de infección por TiLV en un *compartimento* y perdió posteriormente su estatus libre por haberse detectado TiLV en el *compartimento*, pero se han cumplido las condiciones siguientes:

a) todos los *animales acuáticos* dentro del *compartimento* se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo la probabilidad de una mayor transmisión de TiLV, se han completado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.4.) y el *compartimento* se ha sometido a un periodo de *vacío sanitario* según se describe en el Capítulo 4.7.; y

b) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente, incluido el *plan de bioseguridad* en el *compartimento*, han sido debidamente revisados y modificados y se han mantenido ininterrumpidamente desde la repoblación con *animales acuáticos* procedentes de una fuente aprobada libre de patógenos conforme a los requisitos de los Artículos 10.X.9 y 10.X.10. si procede; y

c) ~~se ha aplicado una *vigilancia específica*, de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante al menos [un] año se ha realizado una encuesta para determinar la infección por TiLV al menos [seis meses] luego de la repoblación (tal como se describe en el Artículo 1.4.14.)~~ sin que se haya detectado la presencia del patógeno TiLV.

Artículo 10.X.8.

Conservación del estatus libre

Un país, *zona* o *compartimento* declarados libres de infección por TiLV, de conformidad con lo dispuesto en los Artículos 10.X.4. a 10.X.7. (según proceda), podrán conservar su estatus libre de infección por TiLV si reúnen ininterrumpidamente los requisitos descritos en el Artículo 1.4.15.

Artículo 10.X.9.

Importación de animales acuáticos o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por TiLV

Cuando se importen *animales acuáticos* de una de las especies mencionadas en el Artículo 10.X.2., o *productos de animales acuáticos* derivados de dichas especies, procedentes de un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por TiLV, la *autoridad competente del país importador* deberá exigir que la remesa este acompañada de la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* extendido por la *autoridad competente del país exportador*. El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá acreditar, según los procedimientos descritos en los Artículos 10.X.5., 10.X.6. o 10.X.7. (según proceda) y 10.X.8., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos* o *productos de animales acuáticos* es un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por TiLV.

El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a los *productos de animales acuáticos* enumerados en el Artículo 10.X.3.

Artículo 10.X.10.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por ~~THLV~~ TiLV

---

Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos* de una de las especies mencionadas en el Artículo 10.X.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por TiLV, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del *riesgo* en los apartados 1 y 2 que figuran a continuación:

- 1) Si la intención es el crecimiento y la cría de *animales acuáticos* importados se considerará la aplicación de:
  - a) entrega directa de los *animales acuáticos* importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y
  - b) antes de salir de la *cuarentena* (ya sea en la instalación de origen o en otra instalación de *cuarentena* hasta donde han sido transportados en condiciones adecuadas de *bioseguridad*), los *animales acuáticos* se sacrifican y procesan en uno o más de los *productos de animales acuáticos* enumerados en el Artículo 10.X.3. o en otros productos autorizados por la *autoridad competente*; y
  - c) tratamiento del agua utilizada en el transporte, de los equipos, efluentes y despojos con el fin de inactivar el TiLV, ~~virus de la anemia infecciosa del salmón~~ (de conformidad con los Capítulos 4.4., 4.8. y 5.5.-)

O

- 2) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente:
  - a) en el *país exportador*:
    - i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus *animales acuáticos*;
    - ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de *animales acuáticos* con un alto estatus sanitario para la infección por TiLV;
  - b) en el *país importador*:
    - i) importar la población fundadora (F-0) a una instalación de *cuarentena*;
    - ii) examinar la población F-0 para TiLV de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
    - iii) producir una población de primera generación (F-1) en *cuarentena*;
    - iv) criar la población F-1 en *cuarentena* durante una duración suficiente, y en condiciones favorables, para la expresión clínica de la infección por TiLV, y extraer muestras y realizar pruebas para la detección de TiLV de conformidad con el Capítulo 1.4. del *Código Acuático* y el Capítulo X.X.6. del *Manual Acuático*;
    - v) si no se detecta TiLV, la población F-1 puede ser definida libre de infección por TiLV y liberada de la *cuarentena*;
    - vi) si se detecta el TiLV, la población F-1 no puede ser liberada de la *cuarentena* y deberá sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura de acuerdo con el Capítulo 4.8.

#### Artículo 10.X.11.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos o productos de animales acuáticos de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por TiLV

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de una de las especies mencionadas en el Artículo 10.X.2., o *productos de animales acuáticos* derivados de dichas especies, procedentes de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por TiLV, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 
- 1) entrega directa y mantenimiento de la remesa en instalaciones de *cuarentena* o contención hasta su procesamiento en uno de los productos enumerados en el Artículo 10.X.3. o en el apartado 1 del Artículo 10.X.14. o en otros productos autorizados por la *autoridad competente*; y
  - 2) tratamiento de toda el agua (incluido el hielo), de los equipos, *contenedores* y material de embalaje utilizados para el transporte ~~de modo que~~ a fin de garantizar la inactivación de TiLV o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4., 4.8. y 5.5.; y
  - 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de TiLV o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4. y 4.8.

En lo que se refiere a estos *animales acuáticos* o *productos de animales acuáticos*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellos para fines que no sean el consumo humano.

#### Artículo 10.X.12.

Importación de animales acuáticos o productos de animales acuáticos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación y el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por TiLV

Cuando se importen, para usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, el uso agrícola, industrial, la investigación o farmacéutico, *animales acuáticos* de una de las especies mencionadas en el Artículo 10.X.2., o *productos de animales acuáticos* derivados de dichas especies, procedentes de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por TiLV, la *autoridad competente* del *país importador* deberá requerir:

- 1) los *animales acuáticos* o *productos de animales acuáticos* sean entregados directamente a instalaciones de *cuarentena* y mantenidos en las mismas hasta su procesamiento en uno de los productos mencionados en el Artículo 10.X.3. o en otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) el tratamiento de toda el agua (incluido el hielo), de los equipos, *contenedores* y material de embalaje utilizados para el transporte a fin de garantizar la inactivación del ~~TiLV~~ TiLV o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4., 4.8. y 5.5., y
- 3) el tratamiento de todos los efluentes y despojos garantice la inactivación del ~~TiLV~~ TiLV o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4. y 4.8.

#### Artículo 10.X.13.

Importación de animales acuáticos destinados a uso en laboratorios o zoológicos procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por TiLV

Cuando se importen, para uso en laboratorios o zoológicos, *animales acuáticos* de una de las especies mencionadas en el Artículo 10.X.2. procedentes de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por TiLV, la *autoridad competente* del *país importador* deberá garantizar:

- 1) entrega directa de la remesa a instalaciones de *cuarentena* autorizadas por la *autoridad competente* y mantenimiento en las mismas;
- 2) tratamiento de toda el agua (incluido el hielo), de los equipos, *contenedores* y material de embalaje utilizados en el transporte ~~de modo que~~ en fin de garantizar la inactivación del TiLV o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4., 4.8. y 5.5.; y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos provenientes de las instalaciones de *cuarentena* en los laboratorios o zoológicos, de modo que garantice la inactivación del TiLV o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4. y 4.8.; y

- 
- 4) eliminación de los animales muertos de acuerdo con el Capítulo 4.8.

Artículo 10.X.14.

Importación {o tránsito por el territorio}, para venta directa al por menor para el consumo humano, de productos de animales acuáticos independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por TiLV

- 1) [Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por TiLV, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con el TiLV cuando autoricen la importación (o el tránsito por su territorio) de ~~las~~ los siguientes mercancías productos de animales acuáticos que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.:

- a) filetes o rodajas de pescado (refrigerados)] (en estudio).

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la seguridad sanitaria de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estos *productos de animales acuáticos*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados la utilización de cualquiera de ellos para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen *productos de animales acuáticos*, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 10.X.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por TiLV, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas de mitigación del *riesgo* apropiadas.
-

CAPÍTULO 11.2.  
INFECCIÓN POR *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Artículo 11.2.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies que cumplen con los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5.: ostra plana argentina (*Ostrea puelchana*), *Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*, ostra legamosa australiana (*Ostrea angasi*), ostra plana chilena (*Ostrea chilensis*), *Ostrea equestris*, ostra americana (*Crassostrea virginica*), ostra plana europea (*Ostrea edulis*); ~~y~~ ostra Olímpica (*Ostrea lurida*) ~~y ostra de Suminoc (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*).~~

[...]

---

CAPÍTULO 11.3.  
INFECCIÓN POR *BONAMIA OSTREAE*

[...]

Artículo 11.3.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies que cumplen con los criterios de inclusión en la lista de *especies susceptibles* de acuerdo con el Capítulo 1.5.: Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis, ~~ostra plana europea (*Ostrea edulis*)~~, ostra plana chilena (*Ostrea chilensis*) y ostra plana europea (*Ostrea edulis*), ~~la ostra de Suminoe (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*)~~.

[...]

---

CAPÍTULO 11.4.

INFECCIÓN POR MARTEILIA REFRINGENS

Artículo 11.4.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por *Marteilia refringens* designa una *infección* causada ~~exclusivamente~~ por el agente patógeno *M. refringens* (incluidos los tipos O y M) de la familia *Marteiliidae*.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 11.4.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies: mejillón (*Mytilus edulis*), ostra enana (*Ostrea stentina*), ostra plana europea (*Ostrea edulis*), almeja navaja (*Solen marginatus*), mejillón dorado (*Xenostrobus securis*), ostra legamosa australiana (*Ostrea angasi*), ostra argentina (*Ostrea puelchana*) y ostra plana chilena (*Ostrea chilensis*), mejillón común (*Mytilus edulis*) y mejillón mediterráneo (*Mytilus Galloprovincialis*) y chirla (*Chamelea gallina*). ~~Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el *Manual Acuático* que sean objeto de comercio internacional.~~

---

## Modelo de Artículos 11.X.9. – 11.X.14. para los capítulos específicos de las enfermedades de los moluscos

### CAPÍTULO 11.X. INFECCIÓN POR [PATÓGENO X]

[...]

#### Artículo 11.X.9.

Importación de animales acuáticos ~~o~~ y productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por [Patógeno X]

Cuando se importen *animales acuáticos* ~~y productos de animales acuáticos~~ de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.X.2., ~~o productos de animales acuáticos~~ derivados de dichas especies, procedentes de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el [Patógeno X], la *autoridad competente del país importador* deberá exigir que la remesa esté acompañada de la presentación de un certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos extendido por la *autoridad competente del país exportador*. ~~El certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos deberá acreditar, o por un certificador oficial aprobado por el país importador, que acredite,~~ según los procedimientos descritos en los Artículos 11.X.45., ~~e~~ 11.X.56. o 11.X.7. (según proceda) y 11.1.6.8., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos* ~~o~~ y *productos de animales acuáticos* es un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por [Patógeno X].

El certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las mercancías los productos de animales acuáticos enumerados en **el apartado 1 del** Artículo 11.X.3.

#### Artículo 11.X.10.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por [Patógeno X]

Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos* de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.X.2. procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por [Patógeno X], la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del *riesgo* en los apartados 1 y 2 que figuran a continuación.

- 1) Si la intención es el crecimiento y la cría de *animales acuáticos* importados se considerará la aplicación de:
  - a) entrega directa de los *animales acuáticos* importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; **y**
  - b) antes de salir de la cuarentena (ya sea en la instalación de origen o en otra instalación de cuarentena hasta donde han sido transportados en condiciones adecuadas de bioseguridad), los animales acuáticos se sacrifican y procesan en uno o más de los productos de animales acuáticos enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.X.3. o en otros productos autorizados por la autoridad competente; y
  - c) tratamiento del agua utilizada en el transporte, de los equipos, efluentes y despojos con el fin de inactivar [Patógeno X] de conformidad con los Capítulos 4.4., 4.8. y 5.5.

O

- 2) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente:
- a) en el *país exportador*:
    - i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus *animales acuáticos*;
    - ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de *animales acuáticos* con un alto estatus sanitario para la infección por [Patógeno X];
  - b) en el *país importador*:
    - i) importar la población fundadora (F-0) a instalaciones de *cuarentena*;
    - ii) examinar la población F-0 para el [Patógeno X] de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
    - iii) producir una población de primera generación (F-1) en *cuarentena*;
    - iv) criar la población F-1 en *cuarentena* durante una duración suficiente, y en condiciones favorables, para la expresión clínica de la infección por [Patógeno X] (como descrito en el Capítulo 2.4.X. del Manual Acuático), y extraer muestras y realizar pruebas para la detección de [Patógeno X] de conformidad con el Capítulo 1.4. del Código Acuático y el Capítulo 2.4.X. del Manual Acuático;
    - v) si no se detecta [Patógeno X]., la población F-1 puede ser definida libre de infección por el [Patógeno X]. y liberada de la *cuarentena*;
    - vi) si se detecta [Patógeno X]., la población F-1 no puede ser liberada de la *cuarentena* y deberá sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura de acuerdo con el Capítulo 4.8.

Artículo 11.X.11.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por [Patógeno X]

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos y productos de animales acuáticos* de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.X.2., o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por [Patógeno X], la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa y mantenimiento de los animales la remesa a en centros de *cuarentena* o contención hasta su procesamiento en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.X.3. o en productos descritos en el apartado 1 del Artículo 11.X. 1214., o en otros productos autorizados por la *autoridad competente*; y
- 2) tratamiento de toda el agua (incluido el hielo), de los equipos, contenedores y material de embalaje utilizados para el transporte, y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que a fin de garantizar la inactivación de [Patógeno X] o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4., 4.8. y 5.5.; y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de [Patógeno X] o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4. y 4.8.

En lo que se refiere a estas *mercancías* estos *animales acuáticos o productos de animales acuáticos*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellos para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 11.X.12.

---

Importación de animales acuáticos o productos de animales acuáticos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación y el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por [Patógeno X]

Cuando se importen, para usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación y el uso agrícola, industrial o farmacéutico, animales acuáticos de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.X.2., o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, animales acuáticos de una de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2. procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por [Patógeno X], la autoridad competente del país importador exigirá que:

- 1) los animales acuáticos o productos de animales acuáticos sean entregados directamente a instalaciones de cuarentena y mantenidos en las mismas hasta su procesamiento en uno de los productos mencionados en el punto 1 del Artículo 11.X.3. o en otros productos autorizados por la autoridad competente, y
- 2) el tratamiento de toda el agua (incluido el hielo), de los equipos, contenedores y material de embalaje utilizados para el transporte y el tratamiento de todos los efluentes y despojos a fin de garantizar la inactivación de [Patógeno X] o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4., y 4.8., y 5.5.; y
- 3) el tratamiento de todos los efluentes y despojos garantice la inactivación de [Patógeno X] o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4. y 4.8.

~~Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 11.2.3.~~

#### Artículo 11.X.13.

[Nota: este es nuevo artículo que se armoniza con otros capítulos específicos de enfermedad del Código Acuático.]

Importación de animales acuáticos destinados al uso en laboratorios y zoológicos procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por [patógeno X]

Cuando se importen, para uso en laboratorios o zoológicos, animales acuáticos de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.X.2. procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de [Patógeno X], la autoridad competente del país importador deberá garantizar:

- 1) entrega directa de la remesa a instalaciones de cuarentena autorizadas por la autoridad competente y mantenimiento en las mismas;
- 2) tratamiento de toda el agua (incluido el hielo), de los equipos, contenedores y material de embalaje utilizados para el transporte de modo que garantice la inactivación de [Patógeno X] o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4., 4.8. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos provenientes de las instalaciones de cuarentena en los laboratorios o zoológicos, de modo que garantice la inactivación de [Patógeno X] o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.4. y 4.8., y
- 4) eliminación de los animales muertos de acuerdo con el Capítulo 4.8.

#### Artículo 11.X.1314.

Importación lo tránsito por el territorio, para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y productos de animales acuáticos independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por [Patógeno X] de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de por [Patógeno X]

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por [Patógeno X], las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con la infección por [Patógeno X] cuando autoricen la importación (o el tránsito por su territorio) de las los siguientes mercancías productos de animales acuáticos que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones

---

descritas en el Artículo 5.4.2.

a) [...]

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la seguridad sanitaria de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estos *productos de animales acuáticos*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados la utilización de cualquiera de ellos para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen ~~animales acuáticos y productos de animales acuáticos~~, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.X.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por [Patógeno X], la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas de mitigación del riesgo apropiadas ~~para reducirlo~~.

**Anexo 13. Ítem 8.1. – Definiciones del Glosario: “Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos”, “autoridad competente” y “autoridad veterinaria”**

Artículo	Número de página del Código Acuático	Uso
Guía del usuario: C.8.	vii	5) Las normas de los capítulos del Título 3 tratan del establecimiento, de la conservación y de la evaluación de los Servicios de Sanidad de <u>los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos y los Animales Acuáticos</u> , incluida la comunicación. Esas normas pretenden ayudar a las autoridades competentes de los Países Miembros a cumplir sus objetivos de mejora de la sanidad de los animales acuáticos y del bienestar de los peces de cultivo, y a crear y mantener la confianza en sus certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos.
Guía del usuario: C.8.	ix	8) Certificados sanitarios internacionales para los animales acuáticos Un certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos es un documento oficial que la autoridad competente del país exportador expide de acuerdo con lo dispuesto en los Capítulos 5.1. y 5.2. Los certificados enumeran los requisitos de sanidad de los animales acuáticos que reúne la mercancía exportada. La calidad de los <del>Servicios Veterinarios o los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> del país exportador es esencial para ofrecer garantías a los socios comerciales de la seguridad sanitaria de las mercancías de animales acuáticos exportadas. Esto incluye los principios éticos de <del>los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>la autoridad competente relevante</u> en cuanto a la expedición de certificados sanitarios internacionales y <del>sus</del> <u>los antecedentes de la autoridad veterinaria</u> en el cumplimiento de sus obligaciones de notificación.
Glosario	xiv	<b>NOTIFICACIÓN</b> designa el procedimiento por el que: a. la <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> comunica a la Sede, b. la Sede comunica a <del>las autoridades competentes</del> <u>la autoridad veterinaria</u> de los Países Miembros la aparición de una <i>enfermedad</i> , según lo dispuesto en el Capítulo 1.1.
1.1.1.	1	A efectos del <i>Código Acuático</i> y de conformidad con los Artículos 5, 9 y 10 de los Estatutos orgánicos de la OMSA, todos los Países Miembros reconocen a la <i>Sede</i> el derecho de comunicarse directamente con la <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> de su o sus <i>territorios</i> .  Cualquier <i>notificación</i> o información enviada por la OMSA a una <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> se considerará enviada al Estado al que ésta pertenece y cualquier <i>notificación</i> o información enviada a la OMSA por una <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> se considerará enviada por el Estado al que ésta pertenece.
1.1.3. párrafo 1	2	La <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> , bajo la responsabilidad del Delegado, deberá enviar a la <i>Sede</i> :
1.1.4. párrafo 1	2	La <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> , bajo la responsabilidad del Delegado, deberá enviar a la <i>Sede</i> :
1.1.5. punto 1	2	La <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> de un país en el que está ubicada una <i>zona infectada</i> o un <i>compartimento</i> infectado avisará a la <i>Sede</i> tan pronto como dicho país, <i>zona</i> o <i>compartimento</i> quede libre de la <i>enfermedad</i> .
1.1.5. punto 3	2	La <del>autoridad competente</del> <u>autoridad veterinaria</u> de un País Miembro que establezca una o varias <i>zonas libres</i> o un o varios <i>compartimentos libres</i> deberá notificarlo a la <i>Sede</i> facilitando los datos necesarios, entre los cuales deberán figurar los criterios sobre los que se basa el establecimiento del estatus libre y las condiciones para mantenerlo e

		indicando con claridad la ubicación de las <i>zonas</i> o los <i>compartimentos</i> en un mapa del territorio del País Miembro.
Artículo 3.1.2. punto 7 párrafo 3	32	<del>Los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>Las autoridades competentes</u> deberán definir y documentar las responsabilidades y la estructura (en particular el orden jerárquico) de la organización encargada de la expedición de <i>certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos</i> .
Artículo 3.1.2. punto 10	33	10. <u>Información, reclamaciones y recursos</u> <del>Los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>La autoridad competente relevante</u> deberán comprometerse a atender todas las peticiones de <del>los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos de la autoridad competente</del> de los demás Países Miembros <del>o de cualquier otra autoridad</del> , en especial encargándose de cursar oportunamente las peticiones de información, las reclamaciones o los recursos que éstos presenten.  Se llevará un registro de todas las reclamaciones y recursos presentados, así como del curso dado a los mismos por <del>los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>la autoridad competente</u> .
Artículo 3.1.5. párrafo 4	34	El experto o los expertos facilita(n) la evaluación de los <i>Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</i> del País Miembro aplicando la <i>Herramienta de la OMSA para la Evaluación de las Prestaciones de los Servicios Veterinarios y/o los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos (Herramienta PVS de la OMSA: Animales acuáticos)</i> . El experto o los expertos redacta(n) un informe en colaboración con los <i>Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</i> del País Miembro.
Artículo 3.2.1. párrafo 2	35	El reconocimiento y la incorporación de la comunicación como disciplina de los <i>Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</i> resultan capitales para su funcionamiento. La combinación de la pericia en materia de sanidad de <i>animales acuáticos</i> y de comunicación es esencial para garantizar una comunicación eficaz. <del>La comunicación entre los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos y los Servicios Veterinarios (sobre todo cuando los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos están separados y son independientes de los Servicios Veterinarios) es especialmente importante.</del>
4.2.3. punto 1	50	1) La extensión de una <i>zona</i> será determinada por <del>el Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>la autoridad competente</u> basándose en la definición vigente de <i>zona</i> y será publicada por vía oficial.
4.2.3. punto 3	50	3) Los factores que definen un <i>compartimento</i> serán determinados por <del>el Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>la autoridad competente</u> basándose en criterios pertinentes, como los métodos de gestión y explotación relacionados con la <i>bioseguridad</i> , y serán publicados por vía oficial.
4.2.3. punto 6	50	6) El <i>plan de bioseguridad</i> de un <i>compartimento</i> deberá describir la colaboración entre la industria o empresa pertinente y <del>el Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>la autoridad competente</u> , así como sus responsabilidades respectivas y los procedimientos para la supervisión del funcionamiento del <i>compartimento</i> por <del>el Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>la autoridad competente</u> .
5.3.4. punto 2 a)	85	a) <i>infraestructura</i> : incluye la base legislativa (leyes sobre sanidad de los <i>animales acuáticos</i> , por ejemplo) y los sistemas administrativos (organización de los <i>Servicios Veterinarios</i> y de <del>los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> <u>la autoridad competente</u> por ejemplo);
5.3.7. punto 1 d) i)	88	i) una evaluación de los <del>Servicios Veterinarios o Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> del <i>país exportador</i> ;
5.3.7. punto 2 e) i)	88	ii) una evaluación de los <del>Servicios Veterinarios o Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos</del> del <i>país exportador</i> ;

---

**Anexo 14. Ítem 8.2. – Artículo 1.1.5. del Capítulo 1.1. Notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos**

**CAPITULO 1.1.**

**NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y APORTACIÓN DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

[...]

**Artículo 1.1.5.**

- 1) ~~La autoridad competente de un país en el que está ubicada una zona infectada o un compartimento infectado avisará a la Sede tan pronto como dicho país, zona o compartimento quede libre de la enfermedad.~~
- 2) ~~Podrá considerarse que un país, una zona o un compartimento está nuevamente libre de una enfermedad determinada cuando reúna las debidas condiciones previstas en el Código Acuático.~~
- 3) ~~La autoridad competente de un País Miembro que establezca una o varias zonas libres o un o varios compartimentos libres deberá notificarlo a la Sede facilitando los datos necesarios, entre los cuales deberán figurar los criterios sobre los que se basa el establecimiento del estatus libre y las condiciones para mantenerlo e indicando con claridad la ubicación de las zonas o los compartimentos en un mapa del territorio del País Miembro.~~

**Artículo 1.1.65.**

- 1) Aunque los Países Miembros sólo tendrán la obligación de notificar las *enfermedades de la lista de la OMSA* y las *enfermedades emergentes*, se les alienta a brindar a la OMSA información zoonosanitaria significativa sobre los *animales acuáticos*.
- 2) La Sede deberá comunicar a las *autoridades competentes* por correo electrónico o a través de la interfaz de WAHIS todas las *notificaciones* recibidas en aplicación de los Artículos 1.1.2. a 1.1.54., así como cualquier otra información pertinente.

[...]

---

---

**Anexo 15. Ítem 8.3. – Artículo del Capítulo 1.3. Enfermedades de la lista de la OMSA – Inclusión de las especies de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón**

**CAPÍTULO 1.3.**  
**ENFERMEDADES DE LA LISTA DE LA OMSA**

[...]

Artículo 1.3.1.

Están incluidas en la lista de la OMSA las siguientes *enfermedades* de los peces:

- Infección por *Aphanomyces invadans* (Síndrome ulcerante epizoótico)
- Infección por el alfavirus de los salmónidos
- Infección por **el todos los genogrupos de la especie** virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón
- Infección por el herpesvirosis de la carpa koi
- ~~Infección por el iridovirosis de la dorada japonesa~~
- Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica
- Infección por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
- Infección por el virus de la septicemia hemorrágica viral
- Infección por el virus de la septicemia hemorrágica viral
- Infección por el virus de la tilapia del lago
- Infección por *Gyrodactylus salaris*
- Infección por las variantes con supresión en la HPR y HPRO del virus de la anemia infecciosa del salmón.

[...]

---

**Anexo 16. Ítem 8.3. – Evaluación de la infección por el todos los genogrupos de la especie de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV) para inclusión en la lista de enfermedades del Código sanitario para los animales acuáticos**

**EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL TODOS LOS GENOGRUPOS DE LA ESPECIE DE VIRUS “VIRUS DE LA NECROSIS INFECCIOSA DEL BAZO Y DEL RIÑÓN” (ISKNV) PARA INCLUSIÓN EN LA LISTA DE ENFERMEDADES DEL CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS**

**Resumen de la evaluación**

1. La Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos evaluó la especie del virus de la *necrosis infecciosa del bazo y del riñón*, incluidos sus tres genogrupos, el iridovirus de la dorada japonesa (RSIV), el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV) y el iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo (TRBIV), en función de los criterios de inscripción en la lista de enfermedades de los animales acuáticos del Artículo 1.2.2. del *Código Acuático*.
2. La Comisión para los Animales Acuáticos acordó que el genogrupo del iridovirus de la dorada japonesa (RSIV) (actualmente incluido en el *Código Acuático*), así como los dos genogrupos ISKNV y TRBIV cumplen los criterios de inclusión en la lista 1, 2, 3 y 4b (ver Tabla 1).
3. La Comisión para los Animales Acuáticos observó que los tres genogrupos poseen especies susceptibles que se superponen, una epidemiología y métodos de diagnóstico similares. La Comisión acordó que la enfermedad de la lista propuesta debía denominarse "infección por el todos los genogrupos de la especie de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV)". La infección por el todos los genogrupos de la especie de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón deberá definirse para incluir los genogrupos ISKNV, RSIV y TRBIV, pero excluir las otras especies reconocidas de *Megalocytivirus*, el virus que provoca la caída de escamas o descamación.

	Criterio de la lista						Conclusión
	1	2	3	4a	4b	4c	
Infección por el todos los genogrupos de la especie de virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón	+	+	+	NA	+	-	La enfermedad cumple con los criterios de inclusión en la lista

NA = no se aplica.

**Criterio de inclusión en la lista (Capítulo 1.2. del Código Acuático)**

Los criterios para incluir una enfermedad en la lista de la OMSA son los siguientes:

1. Es probable la propagación internacional del agente patógeno (a través de animales acuáticos, sus productos, vectores o fómites).

Y

2. Al menos un país puede demostrar en el país o en una zona la ausencia de enfermedad en animales acuáticos susceptibles, basándose en las disposiciones del Capítulo 1.4.

Y

3. Se dispone de una definición de caso precisa y existen métodos de detección y diagnóstico fiables.

Y

---

4a. Se ha demostrado la transmisión natural de la enfermedad al ser humano y la infección humana se asocia con consecuencias graves.

O

4b. Se ha demostrado que la enfermedad afecta la sanidad de los animales acuáticos de cultivo a nivel de un país o una zona lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo, pérdidas de producción, morbilidad o mortalidad.

O

4c. Se ha demostrado o las pruebas científicas indican que la enfermedad puede afectar la sanidad de los animales acuáticos silvestres lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo, morbilidad o mortalidad a nivel de la población, productividad reducida o impactos ecológicos.

## Contexto

El *Megalocytivirus* es uno de los siete géneros de la familia *Iridoviridae* y se clasifica dentro de la subfamilia *Alphairidovirinae* junto con los géneros *Ranavirus* y *Lymphocystivirus* (Chinchar *et al.*, 2017; Chinchar *et al.*, 2020). Los megalocytivirus se distinguen de los ranavirus y los linfocistivirus por su capacidad de provocar una ampliación celular marcada en los tejidos infectados y por el análisis de la secuencia de genes virales clave (Chinchar *et al.*, 2017). Los megalocytivirus son los agentes etiológicos de enfermedades graves asociadas a una elevada mortalidad en una serie de especies de peces con aletas de agua dulce y marina (Kurita y Nakajima, 2012, Hick *et al.*, 2016).

El ICTV reconoce dos especies de *Megalocytivirus*: El virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV) y el virus de la enfermedad de la caída de escamas (SDDV) (Chinchar *et al.*, 2017). El SDDV es genética y epidemiológicamente distinto de la especie ISKNV y no se tienen en cuenta en esta evaluación.

Dentro de la especie ISKNV, se reconocieron tres genogrupos: ISKNV, RSIV y TRBIV (Song *et al.*, 2008). Sin embargo, queda por resolver si estos genogrupos representan especies distintas o cepas de una sola especie (Chinchar *et al.*, 2017). Los megalocytivirus recibieron numerosos nombres únicos en función de las especies en las que se detectaron; sin embargo, todas las variantes de la especie ISKNV con los genomas analizados se sitúan dentro de los tres genogrupos: ISKNV, RSIV y TRBIV (Chinchar *et al.*, 2017).

El nombre "ISKNV" se utiliza para una de las dos especies reconocidas de *Megalocytivirus* y también para uno de los tres genogrupos en la especie "ISKNV". En este documento, "genogrupo ISKNV" designa al genogrupo del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV) y "especie ISKNV" se utiliza cuando se refiere solo a la especie del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV).

La infección por el iridovirus de la dorada japonesa (RSIV) fue incluido por primera vez por la OMSA en el *Código Sanitario para los Animales Acuáticos*<sup>1</sup> de 2003 y sigue figurando en el *Código Acuático* de 2022. La enfermedad causada por el RSIV se detectó por primera vez en besugos de acuicultura (*Pagrus major*) en Japón en 1990 (Inouye *et al.*, 1992). El iridovirus de la dorada japonesa se detectó principalmente en peces marinos. Las especies que actualmente figuran en la lista de especies susceptibles de ser infectadas por el iridovirus de la dorada japonesa en el *Código Acuático*<sup>2</sup> de la OMSA son: el besugo (*Pagrus major*), la seriola (*Seriola quinqueradiata*), la serviola (*Seriola dumerili*), la lubina (*Lateolabrax sp.*), la lubina asiática (*Lates calcarifer*), el atún blanco (*Thunnus thynnus*), el pez loro japonés (*Oplegnathus fasciatus*), el jurel rayado (*Caranx delicatissimus*), el pez mandarín (*Siniperca chuatsi*), el corvinón rojo (*Sciaenops ocellatus*), el salmonete (*Mugil cephalus*) y los meros (*Epinephelus spp.*).

El genogrupo ISKNV no figura actualmente en el *Código Acuático*. Desde finales de los años 1980 y 1990 en especies de peces de agua dulce se notificaron viriones morfológicamente compatibles con los iridovirus y que presentan células ampliadas con cuerpos de inclusión compatibles con los megalocytivirus (por ejemplo, Armstrong y Ferguson, 1989; Anderson *et al.*, 1993). El genogrupo ISKNV se detectó en muestras de peces ornamentales de archivo desde 1996 (Go *et al.*, 2006; Go *et al.*, 2016, Becker *et al.*, 2022). La necrosis infecciosa del bazo y del riñón se describió en peces mandarín (*Siniperca chuatsi*; He *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002) y en 2001 se analizó el genoma del ISKNV y se encontró que era genéticamente similar al RSIV (He *et al.*, 2001). El genogrupo del ISKNV se detectó en numerosas especies de

---

<sup>1</sup> El iridovirus de la dorada japonesa (RSIV) se incluyó en el *Código Acuático* antes de 2003 como "otra enfermedad significativa".

<sup>2</sup> Vale aclarar que las especies consideradas susceptibles a la infección por el iridovirus de la dorada japonesa (RSIV), de acuerdo con el Capítulo 1.5. del *Código Acuático* no se han revisado en base a las recomendaciones del grupo *ad hoc*.

---

peces de agua dulce, incluidas algunas asociadas al comercio de peces ornamentales (ver revisión de Johan y Zainathan, 2020; Becker *et al.*, 2022). Este genogrupo se observó en numerosas especies de peces ornamentales objeto de comercio internacional (ver Rimmer *et al.*, 2015). El genogrupo del ISKNV también se notificó como causa de mortalidad masiva en especies importantes para el consumo humano (por ejemplo, Subramaniam *et al.*, 2016; Ramírez-Paredes *et al.*, 2020; Fusianto *et al.*, 2021).

El genogrupo del TRBIV no figura actualmente en el *Código Acuático*. El TRBIV fue descrito por primera vez como causante de enfermedades en el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Shi *et al.*, 2004). El TRBIV causa principalmente enfermedades en peces planos en China y Corea (por ejemplo, Shi *et al.*, 2004; Do *et al.*, 2005), pero también se observó en otras especies, incluso en el comercio de peces ornamentales (Go *et al.*, 2016; Koda *et al.*, 2018). El TRBIV causó la enfermedad en otras especies de peces de cultivo de importancia económica, como la perca marina asiática (*Lates calcarifer*) (Tsai *et al.*, 2020) y la cuchilla barrada (*Oplegnathus fasciatus*) (Huang *et al.*, 2011).

La Comisión para los Animales Acuáticos propuso previamente un enfoque para diferenciar las cepas de patógenos (consulte los informes de las reuniones de [febrero](#) y [octubre de 2011](#) de la Comisión). Se consideraron tres criterios principales para la aplicabilidad de la diferenciación de cepas patógenas en las normas del *Código Acuático* y del *Manual Acuático*: 1) las variantes del patógeno están claramente reconocidas en la literatura científica y tienen diferentes características de la enfermedad; 2) existen métodos robustos para diferenciar las variantes de forma consistente; y 3) existe, o existe la posibilidad de que exista, una gestión diferente de las variantes en o entre países. En el caso de la especie ISKNV, el RSIV se incluyó en la lista antes de la investigación que definió los 3 genogrupos dentro de la especie ISKNV, y sus relaciones genéticas y epidemiológicas. Dado que la infección por el RSIV se incluyó en la lista, pero no los genogrupos de ISKNV y TRBIV, esta evaluación presenta información para cada uno de estos tres genogrupos, a pesar de que los tres genogrupos se propusieron para su inclusión en la lista de forma colectiva junta como la especie ISKNV.

#### **Evaluación con respecto a los criterios de inclusión en la lista**

**Criterio No. 1.** Es probable la propagación internacional del agente patógeno (a través de animales acuáticos, sus productos, vectores o fómites).

##### Evaluación

La especie ISKNV puede transmitirse horizontalmente a través del agua y se sabe que permanece viable en los tejidos congelados del huésped. Se espera que la probabilidad de transmisión sea mayor en el comercio de peces vivos, pero también es posible en productos de animales acuáticos, especialmente si no están eviscerados.

Numerosas especies marinas y de agua dulce son susceptibles al ISKNV y son objeto de comercio internacional, ya sea como animales acuáticos vivos (para consumo humano, acuicultura o con fines ornamentales) o como productos de animales acuáticos.

Por su parte, el iridovirus de la dorada japonesa se detectó en varios países de Asia, donde se asoció a la enfermedad en especies de peces marinos de cultivo (Kurita y Nakajima, 2012). Algunas especies susceptibles se comercializan vivas para el consumo humano (por ejemplo, el besugo y los meros), otras se comercializan como productos de animales acuáticos.

El genogrupo del ISKNV se observó en numerosas especies comercializadas como peces ornamentales y el comercio de peces ornamentales está implicado en la propagación y los brotes de la enfermedad (por ejemplo, Jeong *et al.*, 2008; Johan & Zainathan, 2020). Los peces ornamentales infectados a veces no presentan signos clínicos (por ejemplo, Subramaniam *et al.*, 2014; Rimmer *et al.*, 2015) y, como tales, pueden actuar como portadores del virus. El genogrupo del ISKNV también se detectó en importantes especies de cultivo para el consumo humano que se comercializan a escala internacional, como la tilapia (Ramírez-Paredes *et al.*, 2020). Igualmente, el genogrupo del ISKNV se detectó en peces no procesados utilizados para la alimentación de la acuicultura (Lajimin *et al.*, 2015), es decir, el pescado comercializado para la alimentación o el cebo de la acuicultura puede presentar una vía de transmisión. Se demostró la transmisión de especies de peces de agua dulce a especies de peces marinos por inoculación directa y cohabitación (Jeong *et al.*, 2008b; Go & Whittington, 2019).

El TRBIV está presente en varias especies importantes en el comercio internacional (por ejemplo, el rodaballo, la platija y la lubina asiática), incluyendo el comercio de animales vivos o como productos de animales acuáticos. El análisis filogenético indica la existencia de una reciente propagación internacional del TRBIV (Tsai *et al.*, 2020).

---

Se detectaron variantes de la especie ISKNV en numerosas especies marinas y de agua dulce que se comercializan a escala internacional. Cada uno de los tres genogrupos se ha detectado en productos comercializados y existen pruebas de la propagación internacional asociada con el comercio.

#### Conclusión

Se cumple el criterio.

**Criterio No. 2.** Al menos un país puede demostrar en el país o en una zona la ausencia de *enfermedad* en *animales acuáticos* susceptibles, basándose en las disposiciones del Capítulo 1.4.

#### Evaluación

La infección por RSIV se puede notificar a la OMSA desde 2003. Varios países siguen informando de que nunca se notificó el RSIV en su territorio (ver el Sistema Mundial de Información Zoonosaria de la OMSA) y es probable que algunos de ellos puedan demostrar que están libres de enfermedad.

Se notificó la presencia del genogrupo del ISKNV en numerosas especies de peces comercializados a través del comercio de peces ornamentales y es probable que este genogrupo se propague a través de las cadenas de suministro de peces ornamentales. Sin embargo, algunos países mantienen medidas básicas de bioseguridad para el genogrupo del ISKNV y pueden demostrar que están libres de enfermedad. Además, las pruebas de PCR utilizadas en la vigilancia del RSIV también detectarían el genogrupo del ISKNV, proporcionando pruebas de la ausencia del genogrupo del ISKNV.

El TRBIV se ha detectado principalmente en peces planos de cultivo de China y Corea, pero también en peces ornamentales y en lubinas asiáticas de cultivo. Las pruebas PCR recomendadas en el capítulo del *Manual Acuático* de la OMSA para el RSIV pueden no incluir el TRBIV, lo que da lugar a una menor confianza en la distribución del TRBIV. Sin embargo, dado que el TRBIV demostró su patogenicidad en poblaciones de cultivo de varias especies, es probable que se detecte en esas especies. Aunque no es segura la distribución del TRBIV, es probable que al menos un país pueda declararse libre a nivel de país o de zona.

#### Conclusión

Se cumple el criterio.

**Criterio No. 3.** Se dispone de una definición de caso precisa y existen métodos de detección y diagnóstico fiables

#### Evaluación

Las definiciones de caso para la sospecha y la confirmación de la infección por RSIV están disponibles en el *Manual Acuático* de la OMSA. Dado que algunas de las pruebas PCR para RSIV (y algunos otros métodos, por ejemplo, la histopatología), incluyen el genogrupo del ISKNV, las definiciones de caso podían adaptarse fácilmente para incluir el genogrupo del ISKNV. Kawato *et al.* (2021) compararon el rendimiento analítico de cuatro métodos de PCR en tiempo real para la detección de *Megalocytivirus* (excluyendo el SDDV) y encontraron que tres de los cuatro ensayos detectaron los genogrupos ISKNV, RSIV y TRBIV. Kim *et al.* (2022) informaron sobre el rendimiento de un ensayo de PCR en tiempo real con inclusión de los genogrupos RSIV, ISKNV y TRBIV. Existen suficientes herramientas de diagnóstico disponibles para detectar la especie ISKNV y para construir definiciones de casos que incluyan los tres genogrupos.

#### Conclusión

Se cumple el criterio.

**Criterio No. 4a** Se ha demostrado la transmisión natural de la enfermedad al ser humano y la infección humana se asocia con consecuencias graves.

#### Evaluación

No existe evidencias de la transmisión a los seres humanos.

#### Conclusión

---

No se aplica el criterio.

**Criterio No. 4b** Se ha demostrado que la enfermedad afecta la sanidad de los animales acuáticos de cultivo a nivel de un país o una zona lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo, pérdidas de producción, morbilidad o mortalidad.

#### Evaluación

El RSIV ha causado mortalidades masivas en poblaciones de peces cultivados. La enfermedad se detectó por primera vez en el besugo en Japón y los peces afectados se volvieron letárgicos y mostraron signos de anemia grave, petequias en las branquias y agrandamiento del bazo (Inouye *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1997; Nakajima y Maeno, 1998). Se tomó nota de que el RSIV causa pérdidas de producción, morbilidad y mortalidad en muchas otras especies (por ejemplo, Chao *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003; Girisha *et al.*, 2020; Ni *et al.*, 2021; Sumithra *et al.*, 2022).

El genogrupo del ISKNV se asoció a numerosos casos de enfermedad en peces ornamentales (ver la revisión de Johan & Zainathan, 2020; Becker *et al.*, 2022). También se vinculó con altas mortalidades en importantes especies cultivadas para el consumo humano; por ejemplo, en la lubina asiática (Dong *et al.*, 2017; Kerddee *et al.*, 2021), la tilapia (por ejemplo, Figueiredo *et al.*, 2021; Ramírez-Paredes *et al.*, 2021) y los meros (por ejemplo, Chao *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2020; Fusianto *et al.*, 2021).

El TRBIV ha producido enfermedad y una alta mortalidad en la acuicultura del rodaballo en China (por ejemplo, Shi *et al.*, 2010). Se observaron mortalidades de hasta el 90 % en granjas de lubina asiática en Taiwán (Tsai *et al.*, 2020).

#### Conclusión

Se cumple el criterio.

**Criterio No. 4c** Se ha demostrado o las pruebas científicas indican que la enfermedad puede afectar la sanidad de los animales acuáticos silvestres lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo, morbilidad o mortalidad a nivel de la población, productividad reducida o impactos ecológicos.

#### Evaluación

Existe poca información sobre la aparición de los genogrupos RSIV, ISKNV o TRBIV en poblaciones de peces silvestres y sus consecuencias, como la morbilidad, la mortalidad o el impacto ecológico. Se ha indicado que el genogrupo del ISKNV fue la causa de un evento de mortalidad masiva en una población de cíclidos silvestres en la India (Swaminathan *et al.*, 2022), y también se ha detectado en muchos peces silvestres aparentemente sanos de diversas especies (Wang *et al.*, 2007).

#### Conclusión

El criterio no se cumple.

#### **Referencias**

ARMSTRONG, R. & FERGUSON, H. (1989). Systemic viral disease of the chromide cichlid *Etilapia maculatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **7**, 155-157.

ANDERSON, I.G., PRIOR, H.C., RODWELL, B.J. & HARRIS, G.O. (1993). Iridovirus-like virions in imported dwarf gourami (*Colisa lalia*) with systemic amoebiasis. *Australian Veterinary Journal*, **70(2)**, 66-67.

BECKER, J.A., FUSIANTO, C., HICK, P.M. (2022). Infection with Megalocytivirus in Ornamental Fish. In: *Aquaculture Pathophysiology, Pharmacology and Toxicology* (F. Kibenge, R.S. Chong, B. Baldisserotto, eds), Elsevier. (Currently IN REVIEW).

CHAO, C.B., CHEN, C.Y., LAI, Y.Y., LIN, C.S. & HUANG, H.T. (2004). Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in the grouper *Epinephelus* hybrids infected with grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **58**, 127-142.

- 
- CHEN, X.H., LIN, K.B. & WANG, X.W. (2003). Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. *Journal of Fish Diseases*, **26**, 615-619.
- CHINCHAR, V.R., HICK, P., INCE, I.A., JANCOVICH, J.K., MARSCHANG, R., QIN, Q., SUBRAMANIAM, K., WALTZEK, T.B., WHITTINGTON, R., WILLIAMS, T. & ZHANG, Q. (2017). ICTV Report Consortium ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, **98**, 890-891.
- CHINCHAR, V.G., HICK, P.H., HUANG, J., INCE, I.A., JANCOVICH, J.K., MARSCHANG, R., QIN, Q., SUBRAMANIAM, K., WALTZEK, T.B., WHITTINGTON, R., WILLIAMS, T. & ZHANG, Q. (2020) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, **98**, 890-891.
- DO, J.W., CHA, S.J., KIM, J.S., AN, E.J., LEE, N.S., CHOI, H.J., LEE, C.H., PARK, M.S., KIM, J.W., KIM, Y.C. & PARK, J.W. (2005). Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**, 193-200.
- DONG, H.T., JITRAKORN, S., KAYANSAMRUJ, P., PIRARATE, N., RODKHUM, C., RATTANAROJPONG, T., SENAPIN, S., SAKSMERPROME, V. (2017). Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish & Shellfish Immunology*, **68**, 65-73.
- FIGUEIREDO, H.C.P., TAVARES, G.C., DORELLA, F.A., ROSA, J.C.C., MARCELINO, S.A.C., PIERZAN, F. & PEREIRA, F.L. (2022). First report of infectious spleen and kidney necrosis virus in Nile tilapia in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 3008-3015.
- FUSIANTO, C., HICK, P.M., HERLAMBANG, A., WHITTINGTON, R.J. & BECKER, J.A. (2021). Outbreak investigation attributes Infectious spleen and kidney necrosis virus as a necessary cause of a mortality epidemic in farmed grouper (*Epinephelus* spp.) in Bali, Indonesia. *Aquaculture Reports* **20**, 100723.
- GIRISHA, S.K., PUNEETH, T.G., NITHIN, M.S., NAVEEN KUMAR, B.T., AJAY, S.K., VINAY, T.N. & RAMESH, K.S. (2020). Red sea bream iridovirus disease (RSIVD) outbreak in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in open estuarine cages along the west coast of India: first report. *Aquaculture*, **520**, 734712.
- GO, J., WALTZEK, T.B., SUBRAMANIAM, K., YUN, S.C., GROFF, J.M., ANDERSON, I.G., CHONG, R., SHIRLEY, I., SCHUH, J.C.L., HANDLINGER, J.H., TWEEDIE, A. & WHITTINGTON, R.J. (2016). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126-139.
- GO, J. & WHITTINGTON, R. (2006). Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family Iridoviridae) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture*, **258**, 140-149.
- GO, J. & WHITTINGTON, R.J. (2019). Experimental transmission of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) from freshwater ornamental fish to silver sweep *Scorpius lineolata*, an Australian marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, **137(1)**, 1-21.
- HE, J.G., DENG, M., WENG, S.P., LI, Z., ZHOU, S.Y., LONG, Q.X., WANG, X.Z. & CHAN, S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126-139, doi: 10.1006/viro.2001.1208.
- HE, J.G., ZENG, K., WENG, S.P. & CHAN, S.M. (2000). Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilwsky), in China, *Journal of Fish Diseases*, **23**, 219-222.
- HE, J.G., ZENG, K., WENG, S.P. & CHAN, S.M. (2002), Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), *Aquaculture*, **204**, 11-24. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00639-1.
- HICK, P.M., BECKER, J.A. & WHITTINGTON, R.J. (2016). Iridoviruses of fish In: *Aquaculture Virology* (F. Kibenge and M. Godoy, eds), Elsevier, London, UK, 127-152.
- HUANG, S.M., TU, C., TSENG, C.H., HUANG, C.C., CHOU, C.C., KUO, H.C. & CHANG, S.K. (2011). Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001-2009. *Archives of Virology*, **156**, 1505-1515.
-

- 
- HUANG, Y., CAI, S., JIAN, J., LUI, G., & XU, L. (2020). Co-infection of infectious spleen and kidney necrosis virus and *Francisella* sp. in farmed pearl gentian grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. lanceolatus*) in China — A case report. *Aquaculture*, **526**, 735409.
- INOUE, K., YAMANO, K., MAENO, Y., NAKAJIMA, K., MATSUOKA, M., WADA, Y. & SORIMACHI, M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*, *Fish Pathology*, **27**, 19–27.
- JEONG, J.B., KIM, H.Y., JUN, L.J., LYU, J.H., PARK, N.G., KIM, J.K. & JEONG, H.D. (2008a). Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus diseases in freshwater ornamental fishes, *Diseases of Aquatic Organisms*, **78**, 209–215. doi: 10.3354/dao01879.
- JEONG, J., CHO, H., JUN, L., HONG, S., CHUNG, J. & JEONG, H. (2008b). Transmission of Iridovirus from freshwater ornamental fish (pearl gourami) to marine (rock bream). *Diseases of Aquatic Organisms*, **82(1)**, 27-36.
- JOHAN, C.A.C. & ZAINATHAN, S.C. (2020). Megalocytiviruses in ornamental fish: A review. *Veterinary World*, **13**, 2565–2577.
- JUNG, S.J., OH, M.J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula, *Journal of Fish Diseases*, **23**, 223–226. doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00212.x.
- KERDDEE, P., DINH-HUNG, N., THANH DONG, H., HIRONO, I., SOONTARA, C., AREECHON, N., SRISAPOOME, P. & KAYANSAMRUJ, P. (2021). Molecular evidence for homologous strains of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) genotype I infecting inland freshwater cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) in Thailand. *Archives of Virology*, **166**, 3061–3074.
- KIM, K.H., CHOI, K.M., KANG, G., WOO, W.S., SOHN, M.Y., SON, H.J., YUN, D., KIM, D.H. & PARK, C.I. (2022). Development and Validation of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Red Sea Bream Iridovirus. *Fishes*, **7**, 236. <https://doi.org/10.3390/fishes7050236>
- KODA, S.A., SUBRAMANIAM, K., HICK, P.M., HALL, E., WALTZEK, T.B. & BECKER, J.A. (2023). Partial validation of a TaqMan quantitative polymerase chain reaction for the detection of the three genotypes of *Infectious spleen and kidney necrosis virus*. *PLoS ONE*, **18(2)**:e0281292.
- KODA, S.A., SUBRAMANIAM, K., FLOYD-FRANCIS, R., YANONG, R.P., FRASCA, S., GROFF, J.M., POPOV, V.L., FRASER, W.A., YAN, A., MOHAN, S. & WALTZEK, T.B. (2018). Phylogenomic characterization of two novel members of the genus Megalocytivirus from archived ornamental fish samples. *Diseases of Aquatic Organisms*, **130(1)**, 11-24.
- KURITA, J., NAKAJIMA, K., (2012), Megalocytiviruses, *Viruses*, **4(4)**, 521-538.
- KAWATO, Y., CUMMINS, D.M., VALDETER, S., MOHR, P., ITO, T., MIZUNO, K., KAWAKAMI, H., WILLIAMS, L.M., CRANE, M.ST.J. & MOODY, N.J.G. (2021). Development of New Real-time PCR Assays for Detecting *Megalocytivirus* Across Multiple Genotypes. *Fish Pathology*, **56 (4)**, 177-186. doi.org/10.3147/jsfp.56.177
- LAJIMIN, S., RAZAK, A.A., DENIL, D. J., RANSANGAN, J., ABDUL WAHID, M.E. & SADE, A. (2015). First detection of Megalocytivirus (*Iridoviridae*) in trash fish used for aquaculture feed in Sabah, Malaysia. *Int. J. of Aquatic Science*, **6(1)**: 54-66.
- NAKAJIMA, K., MAENO, Y., HONDA, A., YOKOYAMA, K., TOORIYAMA, T. & MANABE, S. (1999). Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test, *Diseases of Aquatic Organisms*, **36(1)**, 73-5.
- NI, S.Z., WANG, Y.J., HU, J. B., SHI, J., XU, Y., ZHOU, S.M., LI, J.J., HONG, B.H. & QIAN, D. (2021). Identification, histopathology, and phylogenetic analysis of an iridovirus from cultivated silver pomfret in Zhejiang Province, East China. *Aquaculture*, **530**, 735619.
- RAMÍREZ-PAREDES, J.G., PALEY, R.K., HUNT, W., FEIST, S.W., STONE, D.M., FIELD, T.R., HAYDON, D.J., ZIDDAH, P.A., NKANSA, M., GUILDER, J., GRAY, J., DUODU, S., PECKU, E.K., AWUNI, J.A., WALLIS, T.S. & VERNER-JEFFREYS, D.W. (2021). First detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. *Transboundary Emerging Diseases*, **68**, 1550–1563. <https://doi.org/10.1111/tbed.13825>
-

- 
- RIMMER A.E., BECKER J.A., TWEEDIE A., LINTERMANS M., LANDOS M. & WHITTINGTON R.J. (2015). Detection of dwarf gourami iridovirus (Infectious spleen and kidney necrosis virus) in populations of ornamental fish prior to and after importation into Australia, with the first evidence of infection in domestically farmed Platy (*Xiphophorus maculatus*). *Preventive Veterinary Medicine*, **122**, 181-194.
- SHI, C.Y., WANG, Y.G., YANG, S.L., HUANG, J. & WANG, Q.Y. (2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, **236**, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.007>
- SONG, J-Y., KITAMURA, S-I., JUNG, S-J., MIYADAI, T., TANAKA, S., FUKUDA, Y., KIM, S-R. & OH, M-J. (2008). Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses. *Journal of Microbiology*, **46**, 29-33.
- SUBRAMANIAM, K., SHARIFF, M., OMAR, A.R., HAIR-BEJO, M. & ONG, B.L. (2014). Detection and molecular characterisation of infectious spleen and kidney necrosis virus from major ornamental fish breeding states in peninsular Malaysia, *Journal of Fish Diseases*, **37**, 609–618, <https://doi.org/10.1111/jfd.12152>
- SUBRAMANIAM, K., GOTESMAN, M., SMITH, C.E., STECKLER, N.K., KELLEY, K.L., GROFF, J.M. & WALTZEK, T.B. (2016). *Megalocytivirus* infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **119**, 253-258. <https://doi.org/10.3354/dao02985>
- SUMITHRA, T.G., KRUPESHA SHARMA, S.R., NEELIMA, L., DHANUTHA, N.R., JOSHY, A., ANUSREE, V.N., GAYATHRI, S., RAGHU, R.K., PRAVEEN, N.D., THOMAS, S. & RAJESH, K.M. (2022). Red sea bream iridovirus infection in cage farmed Asian sea bass (*Lates calcarifer*): Insights into the pathology, epizootiology, and genetic diversity. *Aquaculture*, **548**, 737571. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737571>
- SWAMINATHAN, T.R., JOHNY, T.K., NITHIANANTHAM, S.R., SUDHAGAR, A., PRADHAN, P.K., SULUMANE RAMACHANDRA, K.S., NAIR, R.R., & SOOD, N. (2022). A natural outbreak of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) threatens wild pearlspot, *Etroplus suratensis* in Peechi Dam in the Western Ghats biodiversity hotspot, India. *Transboundary and Emerging Diseases*, **69(5)**, 1595-1605. <https://doi.org/10.1111/tbed.14494>
- TSAI, J.M., HUANG, S.L. & YANG, C.D. (2020). PCR Detection and Phylogenetic Analysis of *Megalocytivirus* Isolates in Farmed Giant Sea Perch *Lates calcarifer* in Southern Taiwan. *Viruses*, **12(6)**, 681. <https://doi.org/10.3390/v12060681>
- WANG, Y.Q., LÜ, L., WENG, S.P., HUANG, J.N., CHAN, S.M. & HE, J.G. (2007). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis viruslike (ISKNV-like) virus. *Archives of Virology*, **152**, 763–773.

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 8.1.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

[...]

Artículo 8.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. dendrobatidis*

~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. dendrobatidis*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. dendrobatidis*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~

1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. dendrobatidis*:

- a) productos de anfibios termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante por lo menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. dendrobatidis*);
- b) productos de anfibios cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante por lo menos un minuto (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva);
- e) productos de anfibios pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante por lo menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. dendrobatidis*);

d) productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a (es decir, un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos a 100 °C 60°C durante al menos 30 cinco minutos, o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. dendrobatidis*);

e) ~~32~~ cueros elaborados con piel de anfibio.

~~2) Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.1.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 8.1.3., las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 8.1.7. a 8.1.12. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. dendrobatidis*.~~

~~3) Cuando se considere la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una especie no mencionada en el Artículo 8.1.2., pero que razonablemente se podría esperar que represente un~~

---

~~riesgo de transmisión de *B. dendrobatidis*, la autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis.~~

[...]

---

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 8.1.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

[...]

Artículo 8.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. dendrobatidis*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. dendrobatidis*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. dendrobatidis*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. dendrobatidis*;
- 2) cueros elaborados con piel de anfibio.

[...]

---

CAPÍTULO 8.2

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM*  
*SALAMANDRIVORANS*

[...]

Artículo 8.2.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. salamandrivorans*

- 1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. salamandrivorans*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. salamandrivorans*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o a un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. salamandrivorans*:
    - a) productos de anfibios termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante por lo menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. salamandrivorans*);
    - b) productos de anfibios cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante por lo menos un minuto (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. salamandrivorans*);
    - c) productos de anfibios pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante por lo menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. salamandrivorans*);
    - d) 2) productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a (es decir, un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos a 100 °C 60°C durante al menos 30 cinco minutos, o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. salamandrivorans*);
    - e) 3) cueros elaborados con piel de anfibio.
  - 2) Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.2.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 8.2.3., las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 8.2.7. a 8.2.12. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. salamandrivorans*.

- 
- 3) ~~Quando se considere la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una especie no mencionada en el Artículo 8.2.2., pero que razonablemente se podría esperar que represente un riesgo de transmisión de B. salamandrivorans, la autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis.~~

[...]

---

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 8.2.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM*  
*SALAMANDRIVORANS*

[...]

Artículo 8.2.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrivorans*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. salamandrivorans*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. salamandrivorans*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. salamandrivorans*;
- 2) cueros elaborados con piel de anfibio.

[...]

---

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 8.3.

INFECCIÓN POR LAS ESPECIES DE RANAVIRUS

[...]

Artículo 8.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por las especies de *Ranavirus*

1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con las especies de *Ranavirus*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por las especies de *Ranavirus*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:

- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 65-60°C durante por lo menos 30 minutos, o a un tiempo/temperatura equivalente que inactiva todas las especies de *Ranavirus*.
  - a) productos de anfibios termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante por lo menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);
  - b) productos de anfibios cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico de 65 °C durante por lo menos 30 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);
  - c) productos de anfibios pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico de 90 °C durante por lo menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);
  - d) 2) productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a (es decir, un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos a 100 °C 65°C durante al menos 30 minutos, o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que un tiempo/temperatura equivalente que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);
- 2) Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.3.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 8.3.3., las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 8.3.7. a 8.3.12. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por las especies de *Ranavirus*.
- 3) Cuando se considere la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una especie no mencionada en el Artículo 8.3.2., pero que razonablemente se podría esperar que represente un riesgo de transmisión de las especies de *Ranavirus*, la autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis.

---

[...]

---

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

## CAPÍTULO 8.3.

### INFECCIÓN POR LAS ESPECIES DE RANAVIRUS

[...]

#### Artículo 8.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por las especies de *Ranavirus*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con las especies de *Ranavirus*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por las especies de *Ranavirus*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 30 minutos, o a un tiempo/temperatura equivalente que inactiva todas las especies de *Ranavirus*.

[...]

---

CAPÍTULO 9.3.

INFECCIÓN POR *HEPATOBACTER*  
*PENAEI* (HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE)

[...]

Artículo 9.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *H. penaei*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *H. penaei*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *H. penaei*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~63~~95°C durante por lo menos ~~30~~cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *H. penaei*;
- 2) *harina* de crustáceos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~63~~95°C durante por lo menos ~~30~~cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *H. penaei*;
- 3) aceite de crustáceos;
- 4) quitina extraída por medios químicos.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 9.5.

### INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA MIONECROSIS INFECCIOSA

[...]

#### Artículo 9.5.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el virus de la mionecrosis infecciosa, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~60~~75°C durante por lo menos ~~60~~cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la mionecrosis infecciosa;
- 2) *harina* de crustáceos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~60~~75°C durante por lo menos ~~60~~cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la mionecrosis infecciosa;
- 3) aceite de crustáceos;
- 4) quitina extraída por medios químicos.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 9.6.

### INFECCIÓN POR EL NODAVIRUS *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (ENFERMEDAD DE LA COLA BLANCA)

[...]

#### Artículo 9.6.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por MrNV

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con MrNV, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por MrNV:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~60~~50°C durante por lo menos ~~60~~cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el MrNV;
- 2) *harina* de crustáceos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~60~~50°C durante por lo menos ~~60~~cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el MrNV;
- 3) aceite de crustáceos;
- 4) quitina extraída por medios químicos.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 9.7.

### INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL SÍNDROME DE TAURA

[...]

#### Artículo 9.7.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus del síndrome de Taura

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el virus del síndrome de Taura, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus del síndrome de Taura:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 70°C durante por lo menos ~~30~~108 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiven el virus del síndrome de Taura;
- 2) *harina* de crustáceos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 70°C durante por lo menos ~~30~~108 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiven el virus del síndrome de Taura;
- 3) aceite de crustáceos;
- 4) quitina extraída por medios químicos.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 9.10.

# INFECCIÓN POR EL VIRUS IRIDISCENTE DE LOS DECÁPODOS TIPO 1

[...]

### Artículo 9.10.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por DIV1

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con DIV1, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por DIV1:

- 1) ~~{~~*productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 5680°C durante por lo menos 30 minutos, o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que inactive DIV1;
- 2) *harina* de crustáceos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 5680°C durante por lo menos 30 minutos, o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que inactive DIV1;
- 3) aceite de crustáceos;
- 4) quitina extraída por medios químicos. ~~}(en estudio)~~

[...]

---

CAPÍTULO 10.1.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA NECROSIS  
HEMATOPOYÉTICA EPIZOÓTICA

[...]

Artículo 10.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizootica

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el virus de la necrosis hematopoyética epizootica, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizootica:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 15 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la necrosis hematopoyética epizootica;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 15 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la necrosis hematopoyética epizootica;~~
- 3) *harina* de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 15 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la necrosis hematopoyética epizootica;
- 4) *aceite* de pescado;
- 5) *cueros elaborados* con piel de pescado.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.2.

### INFECCIÓN POR *APHANOMYCES INVADANS* (SÍNDROME ULCERANTE EPIZOÓTICO)

[...]

#### Artículo 10.2.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *A. invadans*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1 Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *A. invadans*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *A. invadans*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~60~~100°C durante por lo menos ~~cinco~~un minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *A. invadans*;
- ~~2) pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *A. invadans*;~~
- ~~3) harina~~ de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~60~~100°C durante por lo menos ~~cinco~~un minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *A. invadans*;
- ~~4) aceite~~ de pescado;
- ~~5) pescado eviscerado y congelado;~~
- ~~6) filetes o rodajas de pescado congelado.~~

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.3.

### INFECCIÓN POR *GYRODACTYLUS SALARIS*

[...]

#### Artículo 10.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *G. salaris*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *G. salaris*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *G. salaris*:

- 1) productos de animales acuáticos que han sido sometidos a tratamiento térmico y sellados herméticamente que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 40°C durante por lo menos un minuto, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *G. salaris*;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos;~~
- 3) ~~pescado eviscerado y secado naturalmente (es decir, secado por el sol o el viento);~~
- 4) ~~pescado eviscerado y congelado que haya sido sometido a -18°C o a temperaturas más bajas;~~
- 5) ~~filetes o rodajas de pescado congelado que se hayan sometido a -18°C o a temperaturas más bajas;~~
- 6) ~~pescado eviscerado y refrigerado criado en agua de mar con una salinidad de al menos 25 ppt;~~
- 7) ~~filetes o rodajas de pescado refrigerado de pescados criados en agua de mar con una salinidad de al menos 25 ppt;~~
- 8) ~~productos de pescado refrigerado sin piel, aletas ni branquias;~~
- 9) ~~huevas de pescado no viables;~~
- 10) ~~aceite de pescado;~~
- 11) ~~harina de pescado;~~
- 12) ~~cueros elaborados con piel de pescado.~~

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.4.

# INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN

[...]

### Artículo 10.4.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón

En este artículo, todas las consideraciones se entenderán hechas a cualquier virus detectable de la anemia infecciosa del salmón, incluido el virus de la anemia infecciosa del salmón HPRO.

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el virus de la anemia infecciosa del salmón, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 56°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la anemia infecciosa del salmón;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 56°C durante al menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la anemia infecciosa del salmón;~~
- 3) *harina* de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 56°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la anemia infecciosa del salmón;
- 4) aceite de pescado;
- 5) cueros elaborados con piel de pescado.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.5.

### INFECCIÓN POR EL ALFAVIRUS DE LOS SALMÓNIDOS

[...]

#### Artículo 10.5.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el alfavirus de los salmónidos

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el alfavirus de los salmónidos, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el alfavirus de los salmónidos:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 60 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el alfavirus de los salmónidos;
- ~~2) *pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante al menos 60 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el alfavirus de los salmónidos;*~~
- ~~3) *harina*~~ de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 60 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el alfavirus de los salmónidos;
- 4) aceite de pescado;

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.6.

### INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA NECROSIS HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA

[...]

#### Artículo 10.6.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 90°C durante por lo menos 30 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiven el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 90°C durante por lo menos 30 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiven el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa;~~
- 3) harina de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 90°C durante por lo menos 30 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiven el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa;
- 4) aceite de pescado;
- 5) cueros elaborados con piel de pescado.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.7.

### INFECCIÓN POR EL HERPESVIRUS DE LA CARPA KOI

[...]

#### Artículo 10.7.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el herpesvirus de la carpa koi

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el herpesvirus de la carpa koi, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el herpesvirus de la carpa koi:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 50°C durante por lo menos ~~tres~~un minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el herpesvirus de la carpa koi;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente para alcanzar una temperatura interna de al menos 50°C durante por lo menos tres minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el herpesvirus de la carpa koi;~~
- 3) *harina* de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 50°C durante por lo menos ~~tres~~un minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el herpesvirus de la carpa koi;
- 4) aceite de pescado.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.8.

### INFECCIÓN POR EL IRIDOVIRUS DE LA DORADA JAPONESA

[...]

#### Artículo 10.8.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el iridovirus de la dorada japonesa

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el iridovirus de la dorada japonesa, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el iridovirus de la dorada japonesa:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 56°C durante por lo menos 30 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el iridovirus de la dorada japonesa;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 56°C durante por lo menos 30 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el iridovirus de la dorada japonesa;~~
- 3) *harina* de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 56°C durante por lo menos 30 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el iridovirus de la dorada japonesa;
- 4) aceite de pescado;
- 5) cueros elaborados con piel de pescado.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.9.

### INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA

[...]

#### Artículo 10.9.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el virus de la viremia primaveral de la carpa, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 90°C durante por lo menos 60 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la viremia primaveral de la carpa;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 90°C durante por lo menos 60 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la viremia primaveral de la carpa;~~
- 3) *harina* de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 90°C durante por lo menos 60 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la viremia primaveral de la carpa;
- 4) *aceite* de pescado.

[...]

---

---

## CAPÍTULO 10.10.

### INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL

[...]

#### Artículo 10.10.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus de la septicemia hemorrágica viral

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el virus de la septicemia hemorrágica viral, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la septicemia hemorrágica viral:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~90~~60°C durante por lo menos 60 ~~segundos~~minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la septicemia hemorrágica viral;
- 2) ~~pescado eviscerado y secado por medios mecánicos que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 90°C durante por lo menos 60 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la septicemia hemorrágica viral;~~
- 3) *harina* de pescado que se haya sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos ~~90~~60°C durante por lo menos 60 ~~segundos~~minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el virus de la septicemia hemorrágica viral;
- 4) pescado eviscerado y secado naturalmente (es decir, secado por el sol o el viento);
- 5) aceite de pescado;
- 6) cueros elaborados con piel de pescado.

[...]

---

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

## CAPÍTULO 11.1.

### INFECCIÓN POR EL HERPESVIRUS DEL ABALÓN

[...]

#### Artículo 11.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el herpesvirus del abalón

1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con el herpesvirus del abalón, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el herpesvirus del abalón: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.1.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:

- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121.50°C durante por lo menos 3 cinco minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiva el herpesvirus del abalón:
  - a) productos de abalón termoeesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura);
  - b2) productos de abalón secados por medios mecánicos (es decir, que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante al menos 30 minutos suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o a una combinación equivalente de un tiempo/temperatura que haya demostrado que equivalente que inactiva el herpesvirus del abalón.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.1.7. a 11.1.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el herpesvirus del abalón cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.1.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.1.3.
- 3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.1.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por el herpesvirus del abalón. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.

[...]

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.1.

INFECCIÓN POR EL HERPESVIRUS DEL ABALÓN

[...]

Artículo 11.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el herpesvirus del abalón

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el herpesvirus del abalón, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el herpesvirus del abalón:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 50°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el herpesvirus del abalón.

[...]

---

CAPÍTULO 11.2.

INFECCIÓN POR *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Artículo 11.2.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. exitiosa*

~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. exitiosa*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.2.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~

~~1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 100°C durante por lo menos 15 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. exitiosa*;~~

~~a)12) carne de ostra congelada;~~ y

~~b)23) ostras congeladas con media concha.~~

~~2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.2.7. a 11.2.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.2.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.2.3.~~

~~3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.2.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *B. exitiosa*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.~~

[...]

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.2.

INFECCIÓN POR *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Artículo 11.2.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. exitiosa*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. exitiosa*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 100°C durante por lo menos 15 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. exitiosa*;
- 2) carne de ostra congelada;
- 3) ostras congeladas con media concha.

[...]

---

CAPÍTULO 11.3.

INFECCIÓN POR *BONAMIA OSTREAE*

[...]

Artículo 11.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. ostreae*

~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. ostreae*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. ostreae*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~

1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 100°C durante por lo menos 15 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B.ostreae*:

a) ~~12)~~ carne de ostra congelada, y

b) ~~23)~~ ostras congeladas con media concha.

2) ~~Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.2.7. a 11.2.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.2.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.2.3.~~

3) ~~La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.2.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *B. exitiosa*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.~~

[...]

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.3.

INFECCIÓN POR *BONAMIA OSTREAE*

[...]

Artículo 11.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. ostreae*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. ostreae*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. ostreae*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 100°C durante por lo menos 15 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. ostreae*;
- 2) carne de ostra congelada;
- 3) ostras congeladas con media concha.

[...]

---

---

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.4.

INFECCIÓN POR *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

Artículo 11.4.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *M. refringens*

1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *M. refringens*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *M. refringens*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.4.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:

- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos tres minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *M. refringens*.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.4.7. a 11.4.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *M. refringens* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.4.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.4.3.
- 3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.4.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *M. refringens*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.

[...]

---

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.4.

INFECCIÓN POR *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

Artículo 11.4.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *M. refringens*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *M. refringens*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *M. refringens*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos tres minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *M. refringens*.

---

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

## CAPÍTULO 11.5.

### INFECCIÓN POR *PERKINSUS MARINUS*

[...]

#### Artículo 11.5.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. marinus*

1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *P. marinus*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. marinus*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.5.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:

- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 12160°C durante por lo menos 360 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. marinus*.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.5.7. a 11.5.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. marinus* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.5.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.5.3.
- 3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.5.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *P. marinus*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.

[...]

---

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.5.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS MARINUS*

[...]

Artículo 11.5.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. marinus*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *P. marinus*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *P. marinus*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 60 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. marinus*.

[...]

---

---

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.6.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS OLSENI*

[...]

Artículo 11.6.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. olseni*

1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *P. olseni*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. olseni*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.6.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:

- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121-60°C durante por lo menos 360 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. olseni*.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.6.7. a 11.6.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. olseni* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.6.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.6.3.
- 3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.6.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *P. olseni*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.

[...]

---

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.6.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS OLSENI*

[...]

Artículo 11.6.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. olsenii*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *P. olsenii*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *P. olsenii*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos 60 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. olsenii*.

[...]

---

---

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

## CAPÍTULO 11.7.

### INFECCIÓN POR *XENOHALLOTIS CALIFORNIENSIS*

[...]

Artículo 11.7.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *X. californiensis*

1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *X. californiensis*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *X. californiensis*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.7.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:

- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121.95°C durante por lo menos 3 cinco minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *X. californiensis*.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.7.7. a 11.7.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *X. californiensis* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.7.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.7.3.
- 3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.7.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *X. californiensis*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.

[...]

---

---

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.7.

INFECCIÓN POR *XENOHALIOTIS CALIFORNIENSIS*

[...]

Artículo 11.7.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *X. californiensis*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *X. californiensis*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *X. californiensis*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 95°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *X. californiensis*.

[...]

---

CAPÍTULO 11.5.  
INFECCIÓN POR *PERKINSUS MARINUS*

Artículo 11.5.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por *Perkinsus marinus* designa una *infección* causada ~~exclusivamente~~ por el agente patógeno *P. marinus* de la familia *Perkinsidae*.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 11.5.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies: la ostra americana (*Crassostrea virginica*), ~~la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y la ostra de Suminoe (*Crassostrea ariakensis* (*Magallana* [*Syn. Crassostrea*] *ariakensis*), la ostra de Cortés (*Crassostrea corteziensis*) y la otra palmeada (*Saccostrea palmula*), la almeja de río (*Mya arenaria*), *Macoma balthica* y la almeja americana (*Mercenaria mercenaria*).~~ Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies ~~susceptibles~~ mencionadas en el *Manual Acuático* que sean objeto de *comercio internacional*.

[...]

---

CHAPTER 2.2.1.

ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE

---

1. Scope

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) means infection with strains of *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{\text{AHPND}}$ ) that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB. Although there are reports of the isolation of other *Vibrio* species from clinical cases of AHPND, only  $Vp_{\text{AHPND}}$  has been demonstrated to cause AHPND.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

AHPND has a bacterial aetiology (Kondo *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). It is caused by specific virulent strains of *V. parahaemolyticus* ( $Vp_{\text{AHPND}}$ ) that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) binary toxin, PirA and PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within  $Vp_{\text{AHPND}}$  has been designated pVA1, and its size may vary slightly. Removal (or “curing”) of pVA1 abolishes the AHPND-causing ability of  $Vp_{\text{AHPND}}$  strains.

Within a population of  $Vp_{\text{AHPND}}$  bacteria, natural deletion of the Pir<sup>vp</sup> operon may occur in a few individuals (Lee *et al.*, 2015; Tinwongger *et al.*, 2014). This deletion is due to the instability caused by the repeat sequences or transposase that flank the Pir toxin operon. When the deletion occurs, it means that a  $Vp_{\text{AHPND}}$  strain will lose its ability to induce AHPND. However, if the Pir toxin sequence is used as a target for detection, then a colony that has this deletion will produce a negative result even though the colony was derived from an isolate of AHPND-causing  $Vp_{\text{AHPND}}$ . A recent report describes a naturally occurring deletion mutant of  $Vp_{\text{AHPND}}$  that does not cause a clinical manifestation of AHPND (Aranguren *et al.*, 2020a).

The plasmid pVA1 also carries a cluster of genes related to conjugative transfer, which means that this plasmid is potentially able to transfer to other bacteria.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

AHPND cannot be transmitted from infected samples that have been stored frozen (Tran *et al.*, 2013). Some *Vibrio* species are sensitive to freezing (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson & Thacker, 1973).

2.1.3. Survival and stability outside the host

$Vp_{\text{AHPND}}$  is expected to possess similar properties to other strains of *V. parahaemolyticus* found in seafood that have been shown to survive up to 9 and 18 days in filtered estuarine water and filtered seawater at an ambient temperature of  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  (Karunasagar *et al.*, 1987).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*).

---

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Mortalities occur within 30–35 days, and as early as 10 days, of stocking shrimp ponds with postlarvae (PL) or juveniles (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). De la Pena *et al.* (2015) reported disease outbreaks in the Philippines occurring as late as 46–96 days after pond-stocking.

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Gut including stomach, and hepatopancreas.

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

~~In experimental challenges, *Macrobrachium rosenbergii* and *Cherax quadricarinatus* did not show clinical signs of the disease or histopathological changes induced by AHPND but tested positive by PCR assay. However, whether these species serve as reservoirs of infection or are resistant to AHPND needs further investigation (Powers *et al.*, 2021; Schofield *et al.*, 2020). None known.~~

### 2.2.6. Vectors

No vector is known, although as *Vibrio* spp. are ubiquitous in the marine environment, the possibility that there are vector species could be expected.

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

AHPND is characterised by sudden, mass mortalities (up to 100%) usually within 30–35 days of stocking grow-out ponds with PLs or juveniles (Hong *et al.*, 2016). Older juveniles may also be affected (de la Pena *et al.*, 2015).

In regions where AHPND is enzootic in farmed shrimp, evidence indicates a near 100% prevalence (Tran *et al.*, 2014).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

The onset of clinical signs of disease and mortality can start as early as 10 days post-stocking. Clinical Signs include: of disease in moribund prawns sink to bottom, may include pale to white hepatopancreas (HP) due to pigment loss in the connective tissue capsule (NACA, 2014). Clinical signs include a pale to white hepatopancreas (HP), significant atrophy of the HP, soft shells, guts with discontinuous, or no contents and black spots or streaks visible within the HP (due to melanised tubules). In addition, the HP does not squash easily between the thumb and forefinger (probably due to increased fibrous connective tissue and haemocytetes) (NACA, 2014). Behavioural changes such as frequent sinking to the bottom of tanks may also be noted.

### 2.3.3 Gross pathology

Gross pathological observations include pale-to-white HP, significant atrophy of the HP, soft shells, guts with discontinuous, or no contents and black spots or streaks visible within the HP (due to melanised tubules). In addition, the HP does not squash easily between the thumb and forefinger (probably due to increased fibrous connective tissue and haemocytetes) (NACA, 2014). AHPND has three infection phases. In the acute phase, there is massive and progressive degeneration of the HP tubules from proximal to distal, with significant rounding and sloughing of the HP tubule epithelial cells into the lumen of the tubule, the HP collecting ducts and the posterior stomach and the absence of bacterial cells. In the terminal phase, the HP shows intra-tubular haemocytic inflammation and develops massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells. Animals that survive an acute infection reach a chronic phase, in which they present with limited cellular changes in the hepatopancreas tubule and only a few

---

tubules with epithelial necrosis accompanied by bacteria and inflammation. The chronic phase pathology resembles a septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) (Aranguren *et al.*, 2020a; NACA, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).

#### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

$Vp_{\text{AHPND}}$  has been transmitted experimentally by immersion, feeding (*per os*) and reverse gavage (Dabu *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation.

#### 2.3.5. Environmental factors

Water sources with low salinity (<20 ppt) seem to reduce the incidence of the disease. Peak occurrence seems to occur during the hot, dry season from April to July. Overfeeding, poor seed quality, poor water quality, poor feed quality, algal blooms or crashes are also factors that may lead to occurrences of AHPND in endemic areas (NACA, 2014).

#### 2.3.6. Geographical distribution

The disease was initially reported in Asia in 2010. It has since been reported in the Americas (2013) and Africa (2017).

See WOAHA WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

### 2.4. Biosecurity and disease control strategies

#### 2.4.1. Vaccination

Not available.

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Not available.

#### 2.4.3. Immunostimulation

None known to be effective.

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

Not available.

#### 2.4.5. Inactivation methods

Experimental studies have shown that  $Vp_{\text{AHPND}}$  could not be transmitted via frozen infected shrimp (Tran *et al.*, 2013). Similarly, other strains of *V. parahaemolyticus* are known to be sensitive to freezing, refrigeration, heating and common disinfectants (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson & Thacker, 1973).

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not available.

#### 2.4.7. General husbandry

As with other infectious diseases of shrimp, established good sanitary and biosecurity practices, such as improvement of hatchery sanitary conditions and PL screening are likely to be beneficial; good broodstock management, use of high-quality post-larvae and good shrimp farm management including strict feeding rate control, appropriate stocking density etc. are all well-established practices that reduce the impact of disease, including AHPND. An AHPND-tolerant line of *P. vannamei* was recently reported, but at present (2022) no genetically improved lines are commercially available (Aranguren *et al.*, 2020b).

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

---

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 2.3.2) should be selected for AHPND diagnosis. It is assumed that adults (broodstock) can carry strains of *Vp*<sub>AHPND</sub> (Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). Therefore, broodstock without clinical signs may also be selected for diagnostic testing.

### 3.2. Selection of organs or tissues

Samples may be taken from gut-associated tissues and organs, such as the hepatopancreas, stomach, midgut and hindgut. ~~In the case of valuable broodstock, non-lethal faecal samples may be collected instead, however the utility of faecal samples compared with tissue samples has not been evaluated.~~

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Samples other than gut-associated tissues and organs are not appropriate (NACA, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

### 3.4. Non-lethal sampling

Faecal matter may be collected from valuable broodstock for AHPND diagnosis. However, compared with tissue sampling, the relative utility of faecal samples for detecting AHPND-causing bacteria has not been evaluated.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

### 3.5. Preservation of samples for submission

Samples to be submitted are (i) fresh and chilled on ice for bacterial isolation, (ii) fixed in 90% ethanol for PCR detection and (iii) preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

#### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

High quality samples are essential for successful pathogen isolation and bioassay. Sample quality depends mainly on the time since collection and time spent in storage. Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

#### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animals and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. Alternatively, samples can be preserved in a DNA preservative DNAzol for PCR testing. If material cannot be fixed it may be frozen, but repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans).

#### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

---

Tissue samples for histopathology, immunohistochemistry or in-situ hybridization can be preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

#### 3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

### 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger specimens should be processed and tested individually. Small life stages can be pooled to obtain the minimum amount of material for bacterial isolation or molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
++ =	Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
+ =	Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology		+	+	NA		+	+	NA				
Cell culture <b>Isolation</b>					<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>NA</b>				
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	<u>1</u>
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2	++	++	++	<u>2</u>
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	<u>±2</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay					+	+	+	NA	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>NA</b>
LAMP		++	++	<u>1</u>								
Ab-ELISA												
Ag-ELISA		±	++	<u>1</u>		±	++	<u>1</u>		±	++	<u>1</u>
Other antigen detection methods <sup>3</sup>												
Other methods <sup>3</sup>												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; NA = Not available.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

#### 4.1. Wet mounts

Not applicable.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

Histological examination of AHPND infected shrimp reveals that pathological changes are limited to the hepatopancreas. The disease has three distinct phases:

- i) The acute phase is characterised by a massive and progressive degeneration of the HP tubules from proximal to distal, with significant rounding and sloughing of HP tubule epithelial cells into the HP tubules, HP collecting ducts and posterior stomach. No B-, F- and R-cells are seen in the hepatopancreatic tubule and some nuclei of tubule epithelial cells are enlarged (karyomegaly). No significant bacterial involvement appears during this phase in the absence of bacterial cells (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- ii) The terminal phase is characterised by marked intra-tubular haemocytic inflammation and development of massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells (NACA, 2012-2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- iii) In *Penaeus vannamei* AHPND tolerant lines, a chronic phase can be observed. The chronic phase is characterised by only a few tubules with epithelial necrosis accompanied by bacteria and inflammation. This phase resembles a septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) (Aranguren *et al.*, 2020b).

#### 4.3. Cell culture for Isolation

##### 4.3.1. Enrichment of samples prior to DNA extraction

Preliminary enrichment culture for detection of *Vp*<sub>AHPND</sub> from sub-clinical infections or environmental samples may be carried out using any suitable bacteriological medium (e.g. tryptic-*soy* broth or alkaline peptone water containing 2.5% NaCl supplement) incubated for 4 hours at 30°C with shaking. Then, after letting any debris settle, the bacteria in the culture broth are pelleted by centrifugation. Discarding the supernatant, DNA can be extracted from the bacterial pellet in preparation for PCR analysis.

##### 4.3.2. Agent purification isolation

*Vp*<sub>AHPND</sub> may be isolated in pure culture from diseased shrimp, sub-clinically infected shrimp, or environmental samples using standard microbiological media for isolation of *Vibrio* species from such sources (Lightner, 1996; Tran *et al.*, 2013). Confirmation of identification of *Vp*<sub>AHPND</sub> may be undertaken by PCR analysis.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

##### Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

PCR methods have been developed that target the *Vp*<sub>AHPND</sub> toxin genes. The AP3 method is a single-step PCR that targets the 12.7 kDa PirA<sup>vp</sup> gene (Sirikharin *et al.*, 2015). It was validated for 100% positive and negative predictive value by testing 104 isolates of *Vp*<sub>AHPND</sub> and non-pathogenic bacteria (including other *Vibrio* and non-*Vibrio* species) that had previously been tested by bioassay (Sirikharin *et al.*, 2015). Subsequently, Soto-Rodriguez *et al.* (2015), using 9 *Vp*<sub>AHPND</sub> and 11 non-pathogenic isolates of *V. parahaemolyticus* reported that the AP3 method produced the highest positive (90%) and negative (100%) predictive values of five PCR methods tested.

Single-step PCRs such as the AP3 method and others, e.g. VpPirA-284, VpPirB-392 (Han *et al.*, 2015a) and TUMSAT-Vp3 (Tinwongger *et al.*, 2014), have relatively low sensitivity when used for detection of *Vp*<sub>AHPND</sub> at low levels (e.g. sub-clinical

infections) or in environmental samples such as sediments and biofilms. For such samples, a preliminary enrichment step (see Section 4.3.1. *Enrichment of samples prior to DNA extraction*) is recommended.

Alternatively, a nested PCR method, AP4, has been developed with a 100% positive predictive value for Vp<sub>AHPND</sub> using the same 104 bacterial isolates used to validate AP3 above (Dangtip *et al.*, 2015), and has greater sensitivity (1 fg of DNA extracted from Vp<sub>AHPND</sub>), allowing it to be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

In addition, real-time PCR methods, for example the Vp<sub>AHPND</sub>-specific TaqMan real-time PCR developed by Han *et al.* (2015b), and an isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP) method developed by Koiwai *et al.* (2016) also have high sensitivity and can be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the stomach or hepatopancreatic tissue of putatively infected shrimp, from cultures of purified bacterial isolates or from bacterial pellets from enrichment cultures (see Section 4.3). The amount of template DNA in a 25 µl PCR reaction volume should be in the range of 0.01–1 ng of DNA when extracted from bacterial isolates (i.e. directly from a purified culture) and in the range of 10–100 ng of total DNA when extracted from shrimp tissues or from a bacterial pellet derived from an enrichment culture.

The following controls should be included in all Vp<sub>AHPND</sub>-PCR assays: a) negative extraction control i.e. DNA template extracted at the same time from a known negative sample; b) DNA template from a known positive sample, such as Vp<sub>AHPND</sub>-affected shrimp tissue or DNA from an Vp<sub>AHPND</sub>-positive bacterial culture, or plasmid DNA that contains the target region of the specific set of primers; c) a non-template control. In addition, a further control is required to demonstrate that extracted nucleic acid is free from PCR inhibitors, for example, for shrimp tissues use of the decapod 18S rRNA PCR (Lo *et al.*, 1996) or use the 16S rRNA PCR for bacteria (Weisburg *et al.*, 1991).

#### 4.4.1. Real-time PCR

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
Method 1: Han <i>et al.</i> , 2015b; GenBank Accession No.: KM067908			
<u>pirA</u>	<u>Fwd VpPirA-F: TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG</u> <u>Rev VpPirA-R: GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG</u> <u>VpPirA Probe: FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-</u> <u>GGA-TAMRA</u>	<u>Fwd: 0.3 µM</u> <u>Rev: 0.3 µM</u> <u>probe: 0.1 µM</u>	<u>95°C/20 sec; 45 cycles</u> <u>95°C/3 sec and 60°C/30</u> <u>sec</u>

This protocol is based on the method described by Han *et al.* (2015b). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies) is used and extracted DNA is added to the real-time PCR mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.1 µM probe to a final volume of 10 µl. Real time PCR conditions consist of 20 seconds at 95°C, followed by 45 cycles of 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the completion of the TaqMan real-time PCR assay, the presence of PirA DNA is demonstrated by the presence of specific amplicons, identified by software-generated characteristic amplification curves. No template controls must have no evidence of specific amplicons. The primers and probe and target gene for the Vp<sub>AHPND</sub>-specific real-time PCR are listed in Table 4.4.1.1.

**Table 4.4.1.1.** Primers and probe for the real-time PCR method for detection of pirA toxin gene

<u>Primer/probe name</u>	<u>Sequence (5'–3')</u>	<u>Target gene</u>	<u>Reference</u>
VpPirA-F	TTG GAC TGT CGA ACC AAA CG	pirA	Han <i>et al.</i> , 2015b
VpPirA-R	GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG		
VpPirA-Probe	FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA		

#### 4.4.2. Conventional PCR

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1 (AP1): Flegel &amp; Lo, 2014; GenBank : KP324996; 700 bp</u>			
<u>pVA1</u>	Fwd AP1F: 5CCT TGG GTG TGC TTA GAG GAT G Rev AP1R: GCA AAC TAT CGC GCA GAA CAC C	0.2 µM each	94°C/5 min; 25–30 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec and 72°C/60 sec; final extension step at 72°C/10 min. Reaction mixture can be held at 4°C
<u>Method 2 (AP2): Flegel &amp; Lo, 2014; GenBank : KP324996; 700 bp</u>			
<u>pVA1</u>	Fwd AP2F: TCA CCC GAA TGC TCG CTT GTG G Rev AP2R: CGT CGC TAC TGT CTA GCT GAA G	0.2 µM each	94°C/5 min; 25–30 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/60 sec; final extension step at 72°C/10 min. Reaction mixture can be held at 4°C
<u>Method 13 (AP3): Sirikharin et al., 2015; GenBank Accession No.: JALL01000066.1; amplicon size: 333 bp</u>			
<u>pirA<sup>VP</sup></u>	Fwd AP3-F: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA- CAT-GAA-AC Rev AP3-R: GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA- GAA	0.2 µM each	94°C/5 min; 30 cycles of 94°C/30 sec, 53°C/30 sec, 72°C/40 sec; final elongation step at 72°C/7 min; Reaction mixture can be held at 4°C
<u>Method 24 (TUMSAT-Vp3): Tinwongger et al., 2014; GenBank Accession No.: AB972427; amplicon size: 360 bp</u>			
<u>pVA1</u>	Fwd TUMSAT-Vp3 F: GTG-TTG-CAT-AAT-TTT- GTG-CA Rev TUMSAT-Vp3 R: TTG-TAC-AGA-AAC-CAC- GAC-TA	0.6 µM each	95°C/2 min; 30 cycles of 95°C/30 sec, 56°C/30 sec, 72°C/30 sec
<u>Method 35 (VpPirA-284): Han et al., 2015a; GenBank Accession No.: KM067908; amplicon size: 284 bp</u>			
<u>pirA<sup>VP</sup></u>	Fwd VpPirA-284F: TGA-CTA-TTC-TCA-CGA- TTG-GAC-TG Rev VpPirA-284R: CAC-GAC-TAG-CGC-CAT- TGT-TA	0.2 µM each	94°C/3 min; 35 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec; final extension 72°C/7 min
<u>Method 46 (VpPirB-392): Han et al., 2015a; GenBank Accession No.: KM067908; amplicon size: 392 bp</u>			
<u>pirB<sup>VP</sup></u>	Fwd VpPirB-392F: TGA-TGA-AGT-GAT-GGG- TGC-TC Rev VpPirB-392R: TGT-AAG-CGC-CGT-TTA- ACT-CA	0.2 µM each	94°C/3 min; 35 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec; final extension 72°C/7 min
<u>Method 57 (AP4): Dangtip et al., 2015; GenBank Accession No.: JPKS01000000; amplicon size: 1269 bp</u>			
<u>PirA and PirB toxin genes</u>	<u>Primary</u> Fwd AP4-F1: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA- CAT-GAA-AC Rev AP4-R1: ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA <u>Nested</u> Fwd AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG- GG Rev AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC- TTC	0.2 µM each	<u>Primary</u> 94°C/2 min; 30 cycles of 94°C/30 sec, 55°C/30 sec, 72°C/90 sec; final extension step at 72°C/2 min; hold at 4°C <u>Nested</u> 94°C/2 min; 25 cycles of 94°C/20 sec, 55°C/20 sec, 72°C/20 sec; hold at 4°C
<u>Method 8 (AP4): Dangtip et al., 2015; GenBank : JPKS01000000; amplicon size: 230 bp</u>			

<b>PirA and PirB toxin genes</b>	<b>Fwd AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG</b> <b>Rev AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC</b>	<b>0.2 µM each</b>	<b>94°C/2 min; 25 cycles of 94°C/20 sec, 55°C/20 sec, 72°C/20 sec; hold at 4°C</b>
----------------------------------	---	--------------------	--

#### One-step PCR detection of pVA1 plasmid

Two one-step PCR methods (AP1 and AP2) are described here for detection of the pVA1 plasmid in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.4.2.1.

**Table 4.4.2.1. PCR primers for one-step PCR detection of pVA1 plasmid**

Method name	Primers (5'–3')	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP1	AP1F: 5CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G AP1R: GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C	pVA1	700bp	Flegel & Lo (2014)
AP2	AP2F: TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G AP2R: CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G	pVA1	700bp	Flegel & Lo (2014)

#### Protocol for the AP1 and AP2 PCR methods

This protocol follows the method described by Flegel & Lo (2014). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP1/AP2F, 0.5 µl 10 µM AP1/AP2R, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 0.01–1 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 25–30 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 60 seconds with a final extension step at 72°C for 10 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C (<https://enaca.org/publications/health/disease-cards/ahpnd-detection-method-announcement.pdf>).

#### One-step PCR detection of PirA/PirB toxin genes

Four one-step PCR methods (AP3, TUMSAT Vp3, VpPirA-284 and VpPirB-392) are described here for detection of Pir toxin genes in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.4.2.2.

**Table 4.4.2.2. PCR primers for one-step PCR detection of PirA and PirB toxin genes**

Method name	Primers (5'–3')	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP3	AP3-F: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC AP3-R: GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA	pirA <sup>vp</sup>	333bp	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3-F: GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA TUMSAT-Vp3-R: TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA	pirA <sup>vp</sup>	360bp	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
VpPirA-284	VpPirA-284F: TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG VpPirA-284R: CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA	pirA <sup>vp</sup>	284bp	Han <i>et al.</i> , 2015a
VpPirB-392	VpPirB-392F: TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC VpPirB-392R: TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA	pirB <sup>vp</sup>	392bp	Han <i>et al.</i> , 2015a

#### Protocol for the AP3 PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* (2015). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C.

#### Protocol for the VpPirA-284 and VpPirB-392 PCR methods

This protocol follows the method described by Han *et al.* (2015a) and uses PuReTaq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare). A 25 µl PCR reaction mixture is prepared with PuReTaq ready-to-go PCR beads. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA. For PCR a 3-minute denaturation step at 94°C is followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

#### Protocol for the TUMSAT Vp3 PCR method

This protocol follows the method described by Tinwongger *et al.* (2014). A 30 µl PCR mixture is prepared containing 1 µl DNA template, 10× PCR buffer, 0.25 mM dNTP mixture, 0.6 µM of each primer and 0.01 U Taq polymerase. PCR conditions consist of an initial preheating stage of 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 56°C and 30 seconds extension at 72°C.

#### AP4 nested PCR protocol for detection of Vp<sub>AHPND</sub>

This protocol follows the method described by Dangtip *et al.* (2015). The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP4 F1, 0.5 µl 10 µM AP4 R1, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl<sup>-1</sup>) and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.375 µl 10 µM AP4 F2, 0.375 µl 10 µM AP4 R2, 0.3 µl Taq DNA pol (5 units µl<sup>-1</sup>) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.4.2.3. The expected amplicon sizes are 1269 bp for the outer primers (AP4 F1 and AP4 R1) and 230 bp for the inner primers (AP4 F2 and AP4 R2). At high concentrations of target DNA, additional amplicons may occur as the product of residual primer AP4 F1 pairing with AP4 R2 (357 bp) or AP4 F2 with AP4 R1 (1142 bp) in the nested step.

**Table 4.4.2.3.** Primers for the AP4, nested PCR method for detection of PirA and PirB toxin genes

Method-name	Primers (5'–3')	Expected amplicon-size	Reference
AP4 Step 1	AP4-F1: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC AP4-R1: ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA	1269	Dangtip <i>et al.</i> , 2015
AP4 Step 2	AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	230	

Analysis of conventional PCR products by agarose gel electrophoresis

After PCR, amplicons are visualised by agarose gel electrophoresis. Twenty µl of the PCR reaction mixture, with 6× loading dye added, is loaded onto a 1.5% agarose gel and electrophoresis is carried out at 90 volts for 40 minutes. Amplicons are visualised with SYBR Safe gel stain (Invitrogen, Cat. No. 33102) according to the manufacturer's instructions. Amplicons of the expected size appropriate for the PCR methods used (Tables 4.4.2.1, 4.4.2.2 and 4.4.2.3) indicate a positive result.

#### 4.4.3. Isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP)

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
<u>Method: Koiwai <i>et al.</i>, 2017; GenBank Accession No.: AB972427.1</u>			
Toxin PirAB-like	F3: TGA-TAA-TGC-ATT-CTA-TCA-TCA-GC B3: ATT-TGA-AAG-ACC-AAA-TGA-AAC-C FIP-F1c: GTG-AGC-ACC-TTC-TTA-GTG-GTA-ATA FIP-F2: GTT-GTA-ATT-AAC-AAT-GGC-GCT-AG	F3: 5.0 pmol B3: 5.0 pmol	65°C/60 min and 80°C/5 min

	<u>BIP-B1c: TGA-CGG-AAT-TTA-ACC-CTA-ACA-ATG-C</u> <u>BIP-B2: GCT-TTG-AAA-GCA-TAG-TTA-GGA-TC</u>	<u>FIP: 40 pmol</u> <u>BIP: 40 pmol</u>	
--	--	--	--

#### 4.4.34. Other nucleic acid amplification methods

Cruz-Flores *et al.* (2019) developed a multiplex real-time PCR-based SYBR green assay for simultaneous detection of *pirA*, *pirB*, 16S rRNA and 18S rRNA, and a duplex real-time PCR-based Taqman probe assay showing high specificity and sensitivity – limit of detection was 10 copies for both *pirA* and *pirB*. A recombinase polymerase amplification assay was developed by Mai *et al.* (2021). This assay has a limit of detection of five copies of the *pirAB* gene and high specificity. A LAMP-based assay for AHPND detection developed by Koiwai *et al.* (2016) also shows high specificity and sensitivity.

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

The positive results obtained from conventional PCR described in 4.4.2 need to be confirmed by sequencing.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

ISH is Not currently available (December 2021).

#### 4.7. Immunohistochemistry

An immunohistochemistry assay to detect AHPND was developed by Kumar *et al.*, (2019). However, the assay requires further validation.

#### 4.8. Bioassay

$Vp_{\text{AHPND}}$  has been transmitted experimentally by immersion and by reverse gavage (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation. Thus, following isolation and purification of a bacterium that is suspected to cause AHPND, a bioassay can be performed to confirm the presence of the causative agent. The immersion procedure is carried out by immersing 15 shrimp for 15 minutes, with aeration, in a suspension (150 ml clean artificial seawater) of  $2 \times 10^8$  cells of the cultured bacterium per ml. Following this initial 15-minute period, the shrimp and the inoculum are transferred to a larger tank with a volume of clean artificial seawater to make the final concentration of the bacterium  $2 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . Shrimp are monitored at 6- to 8-hour intervals. Dead shrimp can be processed for  $Vp_{\text{AHPND}}$  PCR and sequence analysis. Moribund or surviving shrimp are processed for histology, bacterial re-isolation, PCR and sequence analysis. A positive bioassay is indicated by the detection of characteristic histological lesions and  $Vp_{\text{AHPND}}$  by PCR and amplicon sequence analysis.

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) for AHPND detection developed by Mai *et al.* (2020) showed high sensitivity (the limit of detection was  $0.008 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  for  $\text{PirA}^{vp}$  and  $0.008 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  for  $\text{PirB}^{vp}$ ) and specificity.

#### 4.10. Other methods

None.

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR (Han *et al.*, 2015b) and conventional PCR (Dangtip *et al.*, 2015) are is-recommended for demonstrating freedom from AHPND in an apparently healthy population.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

---

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status <sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical-Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with AHPND shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by ~~any of the~~ real-time PCR
- ii) A positive result by ~~or conventional PCR methods recommended in Table 4.1~~
- iii) A positive result by LAMP
- iv) Histopathology ~~or cytopathological changes~~ consistent with the ~~presence of the pathogen or the disease~~
- v) A positive result by Ag-ELISA

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{AHPND}$ ) is considered to be confirmed if at least one of the following ~~criterion~~ criteria is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- iii) Positive results by Ag-ELISA and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis

~~Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.~~

## 6.2. Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{AHPND}$ ) shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease ~~as described in this chapter, with or without elevated mortality~~
- ii) A positive result by agent isolation

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

- iii) A positive result by real-time PCR
- iv) A positive result by conventional PCR
- v) **A positive result by bioassay**
- vi) A positive result by LAMP
- vii) A positive result by Ag-ELISA

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{AHPND}$ ) is considered to be confirmed if at least one of the following ~~criterion~~ criteria is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis.
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- iii) Positive results by Ag-ELISA and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis

~~Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.~~

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{AHPND}$ ) are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 **(no data are currently available)**. This information can be used for the design of surveys for infection with *Vibrio parahaemolyticus* ( $Vp_{AHPND}$ ), however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

#### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Conventional PCR	Diagnosis	Clinically diseased and apparently healthy shrimp	AHPND causing and non-causing bacterial isolates	<i>Penaeus vannamei</i>	100	100	Bioassay	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
Conventional PCR	Diagnosis	Clinically diseased and apparently healthy shrimp	AHPND causing and non-causing bacterial isolates	NA	100 <sup>1</sup>	100	Bioassay	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased animals	Hepato-pancreas	<i>Penaeus vannamei</i>	100	NA	Bioassay and histopathology	Han <i>et al.</i> 2015b

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, NA= Not available, PCR: = polymerase chain reaction.

<sup>1</sup>100% sensitivity for TUMSAT-Vp3 primer set.

#### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe	DSp	Reference test	Citation
-----------	--------------	--------------------	------------------------	---------	-----	-----	----------------	----------

--	--	--	--	--	--	--	--	--

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, NA= Not available, PCR: = polymerase chain reaction.

## 7. References

- ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., KANRAR S., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020a). A mutant of *Vibrio parahaemolyticus* *pirAB<sub>VP</sub>* (+) that carries binary toxin genes but does not cause acute hepatopancreatic necrosis disease. *Microorganisms*, **8**, 1549.
- Aranguren Caro L.F., Mai H.N., Noble B. & Dhar A.K. (2020b). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP<sub>AHPND</sub>), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. J. Invertebr. Pathol., 174, 107424. doi: 10.1016/j.jip.2020.107424. Epub 2020 Jun 11.PMID: 32535000
- CRUZ-FLORES R., MAI H.N. & DHAR A.K. (2019). Multiplex SYBR Green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of *Photobacterium* Insect-Related (*Pir*) toxin genes *pirA* and *pirB*. *Mol. Cell. Probes*, **43**, 20–28.
- DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T., ORENSE S.J.A.B., TABARDILLO J.A., CORRE V.L. & MANINGAS M.B.B. (2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48**, 792–799.
- DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–162.
- DE LA PENA L.D., CABILLON N.A.R., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D. & SALOMA C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.
- FLEGEL T.W. & LO C.F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia Pacific, Bangkok, Thailand. <https://enaca.org/enclosure/?id=88>
- GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRÍGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.
- GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.
- HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. (2015a). *Photobacterium* insect related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.
- HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.
- HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.
- JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/140283.pdf>.
- JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.

- 
- KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.
- KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.
- KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.
- KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.
- KUMAR V., BELS L.D., COUCK L., BARUAH K., BOSSIER P. & BROECK W.V.D. (2019). PirABVP Toxin Binds to Epithelial Cells of the Digestive Tract and Produce Pathognomonic AHPND Lesions in Germ-Free Brine Shrimp. *Toxins*, **11**, 717.
- LEE C.T., CHEN I.T., YANG Y.T., KO T.P., HUANG Y.T., HUANG J.Y., HUANG M.F., LIN S.J., CHEN C.Y., LIN S.S., LIGHTNER D.V., WANG A.H., WANG H.C., HOR L.I. & LO C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **112**, 10798–10803.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- LO C.-F., LEU J.-H., HO C.-H., CHEN C.-H., PENG S.-E., CHEN Y.-T., CHOU C.-M., YEH P.-Y., HUANG C.-J., CHOU H.-Y., WANG C.-H. & KOU G.-H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MAI N.H., ARANGUREN L.F.C, CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2021). Development of a Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) detection in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mol. Cell. Probes*, **57**, 101710.
- MAI H.N., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020). Development of an indirect Enzyme Linked Immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against Photorhabdus insect related toxins, PirA<sup>Vp</sup> and PirB<sup>Vp</sup> released from *Vibrio* spp. *J. Microbiol. Methods*, **176**, 106002.
- MUNTADA-GARRIGA J.M., RODRIGUEZ-JEREZ J.J., LOPEZ-SABATER E.I. & MORA-VENTURA M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227.
- NACA (2014). Acute hepatopancreatic necrosis disease card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.
- NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.
- POWERS Q.M., ARANGUREN L.F., FITZSIMMONS K.M., McLAIN J.E. & DHAR A.K. (2021). Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) susceptibility to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *J. Invertebr. Pathol.*, **186**, 107554.
- SCHOFIELD P.J., NOBLE B.L., ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., PADILLA T.J., MILLABAS J. & DHAR A.K. (2020). Pathogenicity of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) on the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*, at various salinities. *Aquac. Res.*, **52**, 1480–1489.
- SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., CHI T.D., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, **10**, e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.
- SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.
-

---

THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.

TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPACK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10**, 14–18.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 45–55.

WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.

YANG Y.T., CHEN I.T., LEE C.T., CHEN C.Y., LIN S.S., HOR L.I., TSENG T.C., HUANG Y.T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.C. & LO C.F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00816-14.

\*  
\* \*

**NB:** There are WOAHP Reference Laboratories for acute hepatopancreatic necrosis disease  
(please consult the WOAHP web site for the most up-to-date list:  
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).  
Please contact the WOAHP Reference Laboratory for any further information on  
acute hepatopancreatic necrosis disease

**NB:** FIRST ADOPTED IN 2017; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

CHAPTER 2.2.3.

INFECTION WITH HEPATOBACTER PENA EI (NECROTISING  
HEPATOPANCREATITIS)

---

1. Scope

~~Infection with infectious salmon anaemia virus (ISAV) means infection with the pathogenic agent highly polymorphic region (HPR)-deleted ISAV, or the non-pathogenic HPRO (non-deleted HPR) ISAV of the Genus *Isavirus* and Family *Orthomyxoviridae*.~~

Infection with ~~*Candidatus*~~ *Hepatobacter penaei* means infection with the pathogenic agent *Candidatus* *H. penaei*, an obligate intracellular bacterium of the Family Holosporaceae, Order Rickettsiales ~~α-Proteobacteria~~.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

*Hepatobacter penaei* is a pleomorphic, Gram-negative, intracytoplasmic bacterium (Nunan *et al.*, 2013). It is a member of the α-Proteobacteria (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). More recently it has been suggested that it belongs to the Family Holosporaceae ~~family~~ within the Order Rickettsiales (Leyva *et al.*, 2018). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 × 0.9 µm), whereas the helical form (0.25 × 2–3.5 µm) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Genetic analysis of *H. penaei* associated with North and South American outbreaks suggests that the isolates are either identical or very closely related subspecies (Loy *et al.*, 1996). ~~Recently~~ Analysis based on the 16S rRNA confirms the high similarity among different *H. penaei* isolates in the Americas (99–100%) (Aranguren & Dhar, 2018).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

*Hepatobacter penaei*-infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine. *Hepatobacter penaei* frozen at –20°C to –70°C and –80°C have been shown to retain infectivity in experimental transmission trials with *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1992). Flash freezing *H. penaei* at –70°C to –80°C does not significantly affect the infectivity (Aranguren *et al.*, 2010; Crabtree *et al.*, 2006).

2.1.3. Survival and stability outside the host

No information available.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* ~~include~~ are: whiteleg shrimp (*P. vannamei*)

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* ~~include~~ are: aloha prawn (*P. marginatus*), banana prawn (*P. merguensis*), blue shrimp (*P. stylirostris*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern brown shrimp (*P. aztecus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*) and northern white shrimp (*P. setiferus*).

---

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: American lobster (*Homarus americanus*) (Avila-Villa *et al.*, 2012; Bekavac *et al.*, 2022).

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Infection with *H. penaei* has been demonstrated in postlarvae (PL), juveniles, adults and broodstock of *P. vannamei* (Aranguren *et al.*, 2006).

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The target tissue is the hepatopancreas: infection with *H. penaei* has been reported in all hepatopancreatic cell types (Lightner 2012). *Hepatobacter penaei* is also present in the faeces (Brinez *et al.*, 2003).

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of *P. vannamei* populations that survive infection with *H. penaei* may carry the intracellular bacteria for life and transmit it to other populations by horizontal transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

### 2.2.6. Vectors

No vectors are known in natural infections.

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Infection with *H. penaei* often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adults and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent, with juveniles always being the most severely affected. Infection with *H. penaei* results in the mortalities approaching 100% in *P. vannamei*, 5.6–15% in *P. duorarum*, and 5–17% in *P. aztecus* (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010).

The prevalence was reported as 0.77% in cultured *P. vannamei* and 0.43% in cultured *P. stylirostris* in Peru (Lightner & Redman, 1994), 5–86.2% in Mexico (Ibarra-Gamez *et al.*, 2007), and 0.6–1.3% in *P. vannamei* in Belize, Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua and Venezuela (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

NHP-affected broodstock ponds in Colombia reported mortalities of up to 85%, while non NHP-affected broodstock ponds in the same farm experienced mortalities of 40–50% (Aranguren *et al.*, 2006).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

A wide range of gross signs can be used to indicate the possible presence of infection with *H. penaei*. These include lethargy, reduced food intake, atrophied hepatopancreas, anorexia and empty guts, noticeably reduced growth and poor length weight ratios ('thin tails'); soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; heavy surface fouling by epicomensal organisms; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic. (Lightner, 1996; Loy *et al.*, 1996).

### 2.3.3 Gross pathology

~~Infection with *H. penaei* often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adult and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent.~~ Gross signs are not specific, but shrimp with acute infection with *H. penaei* show atrophied hepatopancreas, empty guts, soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic. (Lightner, 1996; Loy *et al.*, 1996) ~~a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance including pale discoloration of the hepatopancreas with further size reduction.~~

---

#### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Horizontal transmission of *H. penaei* can be through cannibalism or by contaminated water (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Frelieir *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2004). *Hepatobacter penaei* in faeces shed into pond water has also been suggested as a source of contamination (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). *Hepatobacter penaei*-positive broodstock females produce PL that were also *H. penaei*-positive, which suggests that a transmission from broodstock to progeny can occur (Aranguren *et al.*, 2006).

#### 2.3.5. Environmental factors

The occurrence of infection with *H. penaei* in farms may increase during long periods of high temperatures (>29°C) and high salinity (20–38 ppt) (Morales-Covarrubias, 2010). In the months when temperatures are high during the day and low at night, high prevalence and mortality (>20%) are observed (Morales-Covarrubias, 2010).

#### 2.3.6. Geographical distribution

*Hepatobacter penaei* appears to have a Western Hemisphere distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Del Rio-Rodriguez *et al.*, 2006). In the Western Hemisphere, *H. penaei* is commonly found in cultured penaeid shrimp in the Americas (Aranguren *et al.*, 2010; Frelieir *et al.*, 1992; Ibarra-Gamez *et al.*, 2007; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011). *Hepatobacter penaei*, was introduced into Africa from North America via movement of infected *P.vannamei* broodstock, however NHP was later eradicated by following (Lightner *et al.*, 2012).

See WOAAH WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

### 2.4. Biosecurity and disease control strategies

Early detection (initial phase) of clinical infection with *H. penaei* is important for successful treatment because of the potential for cannibalism to amplify and transmit the disease. Shrimp starvation and cannibalism of infected shrimp, and positive conditions for *H. penaei* enaei-multiplication, are important factors for the spread of *H. penaei* in *P. vannamei*. Preventive measures include raking, tilling, and removing sediments from the bottom of the ponds, prolonged drying (through exposure to sunlight) of ponds and water distribution canals for several weeks, disinfection of fishing gear and other farm equipment using calcium hypochlorite, extensive liming of ponds and the use of ponds liners. The use of specific pathogen-free (SPF) broodstock is an effective preventive measure. NHP, particularly in the initial phase, can be treated by using antibiotics in medicated feeds. ~~*Hepatobacter penaei* is sensitive to oxytetracycline (Lightner & Redman, 1994).~~

#### 2.4.1. Vaccination

No scientifically confirmed reports.

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports.

#### 2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

One population from Latin America that has been selected for several generations for resistance to Taura syndrome virus in the presence of infection with *H. penaei*, seems to be more resistant to NHP disease than the Kona line under experimental conditions (Aranguren *et al.*, 2010).

#### 2.4.5. Inactivation methods

The use of hydrated lime (Ca(OH)<sub>2</sub>) to treat the bottom of ponds during pond preparation before stocking can help reduce infection with *H. penaei*.

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

---

Disinfection of eggs and larvae is a good management practice and is recommended for its potential to reduce *H. penaei* contamination of spawned eggs and larvae (and contamination by other disease agents).

#### 2.4.7. General husbandry

The prevalence and severity of infection with *H. penaei* may be increased by rearing shrimp in relatively crowded or stressful conditions. Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of infection with *H. penaei*. Among these has been the application of PCR to pre-screening of wild or pond-reared broodstock.

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Suitable specimens for testing for infection with *H. penaei* are the following life stages: PL, juveniles and adults.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

*Hepatobacter penaei* infects most enteric tissue. The principal target tissue for *H. penaei* is the hepatopancreas and this organ should be selected preferentially (Lightner, 2012).

#### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

*Hepatobacter penaei* does not replicate in the midgut, caeca, connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells. Samples of pleopods or haemolymph are not recommended for *H. penaei* detection by PCR.

#### 3.4. Non-lethal sampling

*Hepatobacter penaei* can be detected in faeces samples collected from clinically affected populations of *Penaeus vannamei* may be collected and used for testing (usually by PCR), when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Brinez *et al.*, 2003; Frellet *et al.*, 1993; Lightner, 1996). However, the use of faeces samples to detect *H. penaei* NHP in apparently healthy shrimp has not been evaluated. Faeces samples have not been validated to the same level as hepatopancreas samples.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

#### 3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0 *General information (diseases of crustaceans)*

##### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation and results of bioassay depend strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternate storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

##### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples of hepatopancreas or faeces for PCR testing should be preserved in 70–95% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen, but repeated freezing and thawing should be avoided.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information (diseases of crustaceans)*.

---

### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 5.3 of Chapter 2.2.0.

### 3.5.4. Samples for other tests

No scientifically confirmed reports.

## 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger shrimp should be processed and tested individually. Small life stages such as PL or specimens up to 0.5 g can be pooled to obtain the minimum amount of material for *H. penaei* molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
++ =	Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
+ =	Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts						+	+	NA				
Histopathology						++	++	NA				
Cell culture												
Real-time PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	++	++ <sup>+</sup>	++ <sup>+</sup>	1	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	++	++	NA	+	++	++	NA
Bioassay					+	+	+	NA	+	+	+	NA
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods <sup>3</sup>												
Other methods <sup>3</sup>												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available;

PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification;

Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

#### 4.1. Wet mounts

Wet mount squash examination of hepatopancreas tissue is generally conducted to detect presumptive infection with *H. penaei*. The hepatopancreas may be atrophied and have any of the following characteristics: soft and watery; fluid filled centre; pale colour with or without black stripes (melanised tubules). Hepatopancreatic tubules show deformity at the distal portion; multifocal melanisation initially at the distal portion of the tubule and, later on, in the medial and proximal portion; reduced or absence of lipid droplets (Lightner, 2012).

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

Histological methods can be useful for indicating acute and chronic infection with *H. penaei*.

Initial infection with *H. penaei* is difficult to diagnose using routine H&E histological methods. Therefore, molecular methods are recommended for **screening populations for infection with initial** *H. penaei* detection (e.g. by PCR or application of *H. penaei*-specific DNA probes or *in-situ* hybridisation [ISH] of histological sections).

Acute infection with *H. penaei* is characterised by atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule epithelia, presence of bacterial cells and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations). Hypertrophic cells, individual epithelial cells, appeared to be separated from adjacent cells, undergo necrosis and desquamation into the tubular lumen. The tubular epithelial cell lipid content is variable.

The transitional phase of infection with *H. penaei* is characterised by haemocytic inflammation of the intertubular spaces in response to necrosis, cytolysis, and sloughing of hepatopancreas tubule epithelial cells. The hepatopancreas tubule epithelium is markedly atrophied, resulting in the formation of large oedematous (fluid filled or 'watery') areas in the hepatopancreas. Tubule epithelial cells within multifocal encapsulation are typically atrophied and reduced from simple columnar to cuboidal morphology. They contain little or no stored lipid vacuoles, markedly reduced or no secretory vacuoles and masses of bacteria. At this phase haemocyte nodules are observed in the presence of masses of bacteria in the centre of the nodule.

In the chronic phase of infection with *H. penaei*, tubular lesions, multifocal encapsulation and oedematous areas decline in abundance and severity and are replaced by infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. There are areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells with masses of bacteria in the cytoplasm and low numbers of haemocyte nodules.

#### 4.3. Cell culture for isolation

*Hepatobacter penaei* has not been grown ~~*in vitro*~~ **in cell culture**. No crustacean cell lines exist (Vincent & Lotz, 2007).

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

PCR methods including PCR and real-time PCR have been developed that target several *H. penaei* genes including 16S rRNA and **flagella hook** **Flg-E** genes (Aranguren & Dhar, 2018; Aranguren *et al.*, 2010; Loy *et al.*, 1996).

##### Extraction of nucleic acids

**Numerous** Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid **is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.**

##### DNA extraction

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the hepatopancreatic tissue of putatively infected shrimp. The amount of template DNA in a 10–25 µl PCR reaction volume should be in the range of 10–100 ng of total DNA

#### 4.4.1. Real-time PCR

Real-time PCR methods for detection of *H. penaei* have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real-time PCR is ~100 copies of the target sequence from the *H. penaei* genome (Aranguren & Dhar, 2018; Aranguren *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1: Aranguren <i>et al.</i>, 2010; GenBank U65509</u>			
<u><i>H. penaei</i> 16S rRNA-gene</u>	Fwd NHP1300F: CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TAC-AC Rev NHP1366R: GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A Probe: CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA	300 nM 100 nM	40 cycles: 95°C/15 sec and 60°C/1 min
<u>Method 2: Aranguren &amp; Dhar 2018; GenBank JQAJ01000001.1</u>			
<u><i>H. penaei</i> Flagella hook gene-protein</u>	Fwd NHP FlgE3qF: AAC-ACC-CTG-TCT-CCC-CAA-TTC Rev FlgE3qR: CCA-GCC-TTG-GAC-AAA-CAC-CTT Probe: CGC-CCC-AAA-GCA-TGC-CGC	500 nM 100 nM	40 cycles: 95°C/1 sec and 60°C/20 sec

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for *H. penaei* based on the 16S rRNA gene generally follows the method used in Aranguren *et al.* (2010).

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from the 16S, rRNA gene of *H. penaei* (GenBank U65509) (Loy & Frellet, 1996). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP1300F) and downstream (NHP1366R) primer sequences are: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TAC-3' and 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', which corresponds to the region from nucleotides 1321–1340, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) The real-time PCR reaction mixture contains: TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta, Biosciences), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng DNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iii) Amplification is performed with the master cycler Realplex 2.0 (Eppendorf). The cycling consists of initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute. After each cycle, the levels of fluorescence are measured.
- iv) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay. A positive control should also be included, and this can be plasmid-DNA containing the target sequence, purified bacteria, or DNA extracted from *H. penaei* infected hepatopancreas.

#### Protocol 2

Another real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for *H. penaei* is based on the flagella gene (flagella hook protein, flgE) (Aranguren & Dhar, 2018).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the Flg E gene of *H. penaei* (GenBank JQAJ01000001.1) (Aranguren & Dhar, 2018). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 3.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP FlgE3qF) and downstream (FlgE3qR) primer sequences are: 5'-AAC-ACC-CTG-TCT-CCC-CAA-TTC-3'; and 5'-CCA-GCC-TTG-GAC-AAA-CAC-CTT-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CGC-CCC-AAA-GCA-TGC-CGC-3', is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) The real-time PCR reaction mixture contains: The amplification reactions were conducted as follows: 0.5 µM of each primer, 0.1 µM TaqMan probe, 1× TaqMan Fast Virus 1 Step Master Mix (Life Technologies), 5–50 ng DNA template and HPLC water in a reaction volume of 10 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.

- iii) The real-time PCR profile consists of 20 seconds at 95°C followed by 40 cycles of 1 second at 95°C and 20 seconds at 60°C. Amplification detection and data analysis for real-time PCR assays are carried out with the StepOnePlus real-time PCR system (Life Technologies).
- iv) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay. A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, or DNA extracted from *H. penaei*-infected hepatopancreas.

#### 4.4.2. Conventional PCR

Hepatopancreas may be assayed for *H. penaei* using PCR. Two different PCR methods have been developed for *H. penaei* detection using 16S rRNA gene and **Flg E flagella hook** gene separately.

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1: Aranguren et al., 2010; GenBank Accession No.: MH230908.1; amplicon size 379 bp</u>			
<u><i>H. penaei</i>/16S rRNA gene</u>	Fwd NHPF2: CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAG-T Rev NHPR2: GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C	200 nM	35 cycles: 95°C/30 sec, 60°C/30 sec and 72°C/30 sec
<u>Method 2: Aranguren &amp; Dhar, 2018; GenBank Accession No.: JQAJ01000001.1; amplicon size 333 bp</u>			
<u><i>H. penaei</i>/ Flagella hook gene protein</u>	Fwd FlgE 1143F: AGG-CAA-ACA-AAC-CCT-TG Rev FlgE 1475R: GCG-TTG-GGA-AAG-TT	0.2 µM-200 nM	35 cycles,; 95°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec

#### Protocol 1

The PCR based on 16S rRNA is based on Aranguren *et al.* (2010). Primers designated as NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' and NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', amplify a 379-base pair (bp) fragment corresponding to the 16S rRNA of *H. penaei*. The PCR method outlined below generally follows the method described in Aranguren *et al.* (2010).

- i) The following controls should be included when performing the PCR assay a) known *H. penaei* negative tissue sample; b) a known *H. penaei* positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.
- ii) The PuReTaq™ Ready To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.
- iii) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25 µl total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 µM each), dNTPs (200 µM each), Taq polymerase (0.1 U µl<sup>-1</sup>), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- iv) The cycling parameters are: Step 1: 95°C for 5 minutes, 1 cycle; Step 2: 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, 35 cycles; Step 3: 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, 1 cycle; 4°C infinite hold.

#### Protocol 2

The PCR based on flagella gene (flagella hook protein, flgE) is based on Aranguren & Dhar (2018). Primers designated as NHP FlgE 1143F (5'-AGG-CAA-ACA-AAC-CCT-TG-3') and the NHP FlgE 1475R (5'-GCG-TTG-GGA-AAG-TT-3') amplify a 333-base pair (bp) fragment corresponding to the Flg E of *H. penaei*.

- i) The following controls should be included when performing the PCR assay a) known *H. penaei* negative tissue sample; b) a known *H. penaei* positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.
- ii) The PuReTaq™ Ready To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.

- 
- iii) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25- $\mu$ l total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2  $\mu$ M each), dNTPs (200  $\mu$ M each), Taq polymerase (0.1 U  $\mu$ l<sup>-1</sup>), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- iv) The cycling parameters are: initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 62°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 5 minutes followed by 4°C infinite hold.

Note: The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None.

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

PCR products may be cloned and sequenced or sequenced directly when necessary to confirm infection with *H. penaei* or to identify false positives or nonspecific amplification (Aranguren *et al.*, 2010; Aranguren & Dhar, 2018; Vincent & Lotz, 2005).

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

The ISH method of Loy & Frelier (1996) and Lightner (1996) provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for *H. penaei* detection and diagnosis of infection that employ classical histological methods (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). The ISH assay of routine histological sections of acute, transition and chronic phase lesions in hepatopancreas with a specific DIG-labelled DNA probe to *H. penaei* 16S rRNA provides a definitive diagnosis of infection with *H. penaei* (Lightner, 1996; Loy & Frelier, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Pathognomonic *H. penaei* positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the DNA probes. (See Chapter 2.2.4 *Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

#### 4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) tests using monoclonal antibodies (MAbs) to *H. penaei*, according to the methods described in Bradley-Dunlop *et al.* (2004), ~~are available~~ exist for *H. penaei* detection.

#### 4.8. Bioassay

Confirmation of infection with *H. penaei* may be accomplished by bioassay of suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the intracellular bacteria (Aranguren *et al.*, 2010; Lightner, 2005). Oral protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped hepatopancreas of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks. The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only a normal feed, is required. When the hepatopancreas feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for *H. penaei*, positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of infection with *H. penaei* and unusual mortalities.

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Serological tests are not applicable because shrimp are invertebrate animals that do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to *H. penaei*.

---

#### 4.10. Other methods

No scientifically confirmed reports.

#### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR ~~are~~ is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom from infection with *H. penaei* in apparently healthy populations as described in Section 4.4.1 ~~and 4.4.2~~.

#### 6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory-Competent Authority does not have the capacity-capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

#### 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status <sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. ~~Hydrographical~~ ~~Geographical~~ proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

##### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by real-time PCR
- ii) A positive result by conventional PCR

##### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by two different probe-based real-time PCR tests targeting different region of the *H. penaei* genome
- ii) A positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting different region of the *H. penaei* genome followed by amplicon sequencing

~~Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.~~

#### 6.2. Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

##### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

The presence of infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs consistent with *H. penaei* infection
- ii) Histopathology consistent with *H. penaei* infection
- iii) A positive result by real-time PCR
- iv) A positive result by conventional PCR
- v) A positive result by *in-situ* hybridisation
- vi) A positive result by bioassay

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if at least at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by two different probe-based real-time PCR tests targeting different regions of the *H. penaei* genome
- ii) A positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting different regions of the *H. penaei* genome followed by amplicon sequencing
- iii) ~~Histopathology consistent with *H. penaei* and positive *in-situ* hybridisation test~~ A positive result by *in-situ* hybridisation and real-time PCR
- iv) A positive result by *in-situ* hybridisation and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- v) ~~A positive result by bioassay followed by real-time PCR~~
- vi) ~~A positive result by bioassay followed by conventional PCR followed by amplicon sequencing~~

~~Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.~~

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *H. penaei* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. (no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with *H. penaei*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

#### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe ( <i>n</i> )	DSp ( <i>n</i> )	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study,  
PCR: = polymerase chain reaction, ND = Not determined.

#### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe ( <i>n</i> )	DSp ( <i>n</i> )	Reference test	Citation

---

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study,  
PCR: = polymerase chain reaction.

## 7. References

- AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.
- ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.
- ARANGUREN L.F. & DHAR ARUN K. (2018). Detection and quantification of *Hepatobacter penaei* bacteria (NHPB) by new PCR and real-time quantitative PCR assays. *Dis. Aquat. Org.*, **131**, 49–57.
- ARANGUREN L.F., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.
- AVILA-VILLA L.A., GOLLAS-GALVAN T., MARTINEZ-PORCHAS M., MENDOZA-CANO F. & HERNANDEZ-LOPEZ J. (2012). Experimental infection and detection of necrotizing hepatopancreatitis bacterium in the American lobster *Homarus americanus*. *Sci. World J.*, **2012**, 979381, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356760/>
- BEKAVAC A., BECK A., DRAGIČEVIĆ P., DRAGUN Z., MAGUIRE I., IVANKOVIĆ D., FIKET Ž., GRAČAN R., HUDINA S. (2022). Disturbance in invasion? Idiopathic necrotizing hepatopancreatitis in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) in Croatia. *J. Fish Dis.*, **45**, 261–276.
- BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.
- BRINEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 69–72.
- CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.
- DEL RÍO-RODRIGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, 606–609.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.
- FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.
- GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPÍZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-GAMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Cienc. Mar.*, **33**, 1–9.
- KROL R.M., HAWKINS W.E. & OVERSTREET R.M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebr. Pathol.*, **57**, 362–370.
- LEYVA J.M., MARTINEZ-PORCHAS M., HERNANDEZ-LOPEZ J., VARGAS-ALBORES F. & T. GOLLAS-GALVAN (2018). Identifying the causal agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp: Multilocus sequence analysis approach *Aquaculture Res.*, 1–8.

---

LIGHTNER D.V. (ed.) (1996). A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., TASCA S.I. & TEMPLETON J.W. (1996). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.

LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.

LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8. 1-180.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., RUIZ-LUNA A., MOURA-LEMUS A.P., SOLÍS MONTIEL V.T. & CONROY G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamérica. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, **XXI**, 434–446.

NUNAN L.M., PANTOJA C.R., GOMEZ-JIMENEZ S. & LIGHTNER D.V. (2013). “*Candidatus* Hepatobacter penaei,” an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 1407–1409.

VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to Kona stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

\*  
\* \*

**NB:** There is a WOA Reference Laboratory for infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis)  
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:  
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).  
Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on  
infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis).

**NB:** FIRST ADOPTED IN 2012; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.4.

INFECTION WITH INFECTIOUS HYPODERMAL  
AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

---

1. Scope

Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus means infection with the pathogenic agent *Decapod penstylhamaparvovirus 1*, of the Genus *Penstylhamaparvovirus* and Family *Parvoviridae* ~~infection with the pathogenic agent infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV), Family *Parvoviridae*, subfamily *Hamaparvovirinae*, Genus *Penstylhamaparvovirus* with IHNV (*Decapod penstylhamaparvovirus 1*) as the Type species (Penez *et al.*, 2020).~~

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

IHNV is the smallest of the known penaeid shrimp viruses. The virion is a 20–22 nm, non-enveloped icosahedron, with a density of 1.40 g ml<sup>-1</sup> in CsCl that contains linear single-stranded DNA with an estimated size of 3.9 kb ([GenBank NC\\_002190](#)), and has a capsid with four polypeptides of molecular weight 74, 47, 39, and 37.5 kD (Bonami *et al.*, 1990; Nunan *et al.*, 2000; ~~GenBank NC\_002190~~).

At least two distinct genotypes of IHNV have been identified (Tang *et al.*, 2003): Type 1 is from the Americas and South-East Asia (principally the Philippines) and Type 2 is from South-East Asia. These genotypes were shown to be are-infectious to *Penaeus vannamei* and *P. monodon* (Tang *et al.*, 2003). IHNV genotypes in Ecuador and Peru were found to be within a separate lineage of IHNV type 2 genotypes circulating within these countries (Aranguen Caro *et al.*, 2022). Two sequences homologous to part of the IHNV genome are found embedded in the genome of penaeids. These were initially described as Type 3A from East Africa, India and Australia, and Type 3B from the western Indo-Pacific region including Madagascar, Mauritius and Tanzania (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Tissues containing the IHNV-homologous sequences (also known as endogenous viral elements; Taengchaiyaphum *et al.*, 2021) in the *P. monodon* genome are not infectious to susceptible host species (Lightner *et al.*, 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

IHNV is believed to be the most stable virus of the known penaeid shrimp viruses. Infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1987; Lightner *et al.*, 2009).

2.1.3. Survival and stability outside the host

No data.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: yellowleg shrimp (*Penaeus californiensis*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), and white leg shrimp (*Penaeus vannamei*).

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*). ~~Evidence is lacking for this species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is IHNV, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.~~

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: ~~giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*), western white shrimp (*P. occidentalis*), kuruma prawn (*P. japonicus*), green tiger prawn (*P. semisulcatus*), *Hemigrapsus penicillatus*, Argentine stiletto shrimp (*Artemesia longinaris*), Cuata swimcrab (*Callinectes arcuatus*), Mazatlan sole (*Achirus mazatlanus*), yellowfin mojarra (*Gerres cinereus*), tilapias (*Oreochromis* sp.), Pacific piquitinga (*Lile stolifera*) and blackfin snook (*Centropomus medius*).~~

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
<u>Achiridae</u>	<u><i>Achirus mazatlanus</i></u>	<u>Mazatlan sole</u>
<u>Centropomidae</u>	<u><i>Centropomus medius</i></u>	<u>blackfin snook</u>
<u>Cichlidae</u>	<u><i>Oreochromis</i> sp.</u>	<u>tilapias</u>
<u>Clupeidae</u>	<u><i>Lile stolifera</i></u>	<u>Pacific piquitinga</u>
<u>Gerreidae</u>	<u><i>Gerres cinereus</i></u>	<u>yellowfin mojarra</u>
<u>Palaemonidae</u>	<u><i>Macrobrachium rosenbergii</i></u>	<u>giant river prawn</u>
<u>Penaeidae</u>	<u><i>Penaeus duorarum</i></u>	<u>northern pink shrimp</u>
	<u><i>Penaeus occidentalis</i></u>	<u>western white shrimp</u>
	<u><i>Penaeus japonicus</i></u>	<u>kuruma prawn</u>
	<u><i>Penaeus semisulcatus</i></u>	<u>green tiger prawn</u>
	<u><i>Artemesia longinaris</i></u>	<u>Argentine stiletto shrimp</u>
<u>Portunoidea-Portunidae</u>	<u><i>Callinectes arcuatus</i></u>	<u>Cuata swimcrab</u>
<u>Varunidae</u>	<u><i>Hemigrapsus penicillatus</i></u>	

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

IHNV has been detected in all life stages (i.e. eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) of *P. vannamei*. Nauplii produced from infected broodstock have a high prevalence of infection with IHNV (Motte *et al.*, 2003).

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

IHNV targets gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, lymphoid organ, parenchymal cells, connective tissue cells and ovaries (Chayaburakul, 2005; Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998).

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of *P. stylirostris* and *P. vannamei* populations that survive IHNV infection may carry the virus subclinically and infect their progeny or other populations by vertical and horizontal transmission (Bell & Lightner, 1984; Lightner, 1996; Motte *et al.*, 2003).

### 2.2.6. Vectors

~~IHNV was found in wild crabs~~ has been detected in many crustacean and non-crustacean species however their (*Hemigrapsus penicillatus*, *Neohelice granulata*), but there were no clinical signs. Adults of *Macrobrachium rosenbergii* are carriers of IHNV without apparent signs. Although the mussel *Mytilus edulis* is an important reservoir of IHNV (Wei *et al.*, 2017), its capacity to transmit virus is unknown.

## 2.3. Disease pattern

---

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

The effects of infection with IHNV varies among shrimp species and populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with IHNV results in acute, usually catastrophic, disease with mortalities approaching 100%. Vertically infected larvae and early postlarvae do not become diseased, but in approximately 35-day-old or older juveniles, gross signs of the disease may be observed, followed by mass mortalities. In horizontally infected juveniles, the incubation period and severity of the disease is somewhat size- or age-dependent, with young juveniles always being the most severely affected. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Bell & Lightner, 1984; 1987; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983).

In contrast, in populations of *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and some populations of *P. monodon*, infection with IHNV results in a more subtle, chronic disease, runt-deformity syndrome (RDS), in which high mortalities are unusual, but where growth suppression and cuticular deformities are common (Kalagayan *et al.*, 1991; Sellars *et al.*, 2019). The severity and prevalence of RDS in infected populations of juvenile or older *P. vannamei* may be related to infection during the larval or early postlarval stages.

~~Infection with IHNV interferes with normal egg, larval, and postlarval development. When broodstock are used from wild or farmed stocks where the disease is enzootic, hatching success of eggs may be reduced, and survival and culture performance of the larval and postlarval stages lowered (Motte *et al.*, 2003).~~

There was no mortality or clinical signs of disease in *P. vannamei*, *P. monodon* or *P. stylirostris* when experimentally challenged with IHNV genotypes from Ecuador and Peru (Aranguen Caro *et al.*, 2022). The IHNV genotypes were found to be within a separate lineage of IHNV type 2 genotypes circulating within these countries (Aranguen Caro *et al.*, 2022).

~~In the past, stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults, and adults showed persistently high mortality rates due to infection with IHNV. However, selected lines of *P. stylirostris* do not show mortality and appear to be tolerant to this virus. *Penaeus vannamei* and *P. monodon* stocks infected with IHNV show poor and highly disparate growth and cuticular deformities, particularly bent rostrums and deformed sixth abdominal segments (Jagadeesan *et al.*, 2019; Sellars *et al.*, 2019).~~

In regions where the virus is enzootic in wild stocks, the prevalence of IHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja *et al.*, 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan *et al.*, 2001); from 51 to 63% in *P. vannamei* collected from the Pacific coasts of Ecuador, Colombia and Panama (Motte *et al.*, 2003), and from 6 to 63% in *P. vannamei* broodstock and 49.5% in post-larvae from Mexico (Fernando *et al.*, 2016). In farms where IHNV is present, its prevalence can range from very low to 100%, but high prevalence is typical (Aly *et al.*, 2021; Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Animals with this disease may show one or more of these signs, but the pathogen may still be present in the absence of any signs. Clinical signs are non-specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute infection with IHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species infected with IHNV have been observed to rise slowly in culture tanks to the water surface, where they become motionless and then roll-over and slowly sink (ventral side up) to the tank bottom. Shrimp exhibiting this behaviour may repeat the process for several hours until they become too weak to continue, or until they are attacked and cannibalised by their healthier siblings.

Certain cuticular deformities, specifically a deformed rostrum bent to the left or right, which may be presented by *P. vannamei* and *P. stylirostris* with RDS, are indicative of infection with IHNV (see Section 2.3.3 *Gross pathology: Infection with IHNV in Penaeus vannamei*). However, this clinical sign is not always apparent in shrimp populations chronically infected with IHNV.

In acute disease, *P. stylirostris* may present behavioural changes (see Section 2.3.3 *Gross pathology: Infection with IHNV in Penaeus stylirostris*) but with RDS, no consistent behavioural changes have been reported for affected shrimp.

---

Infection with IHNV interferes with normal egg, larval, and postlarval development. When broodstock are used from wild or farmed stocks where the disease is enzootic, hatching success of eggs may be reduced, and survival and culture performance of the larval and postlarval stages lowered (Motte *et al.*, 2003).

### 2.3.3. Gross pathology

#### *Infection with IHNV in Penaeus stylirostris*

Infection with IHNV may result in acute disease with very high mortalities in juveniles. Vertically infected larvae and early postlarvae do not become diseased, but in approximately 35 day old or older juveniles, gross signs of the disease may be observed, followed by mass mortalities. In horizontally infected juveniles, the incubation period and severity of the disease is somewhat size- or age-dependent, with young juveniles always being the most severely affected. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Bell & Lightner, 1984; 1987; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983). Gross signs are non-specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute infection with IHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species infected with IHNV have been observed to rise slowly in culture tanks to the water surface, where they become motionless and then roll over and slowly sink (ventral side up) to the tank bottom. Shrimp exhibiting this behaviour may repeat the process for several hours until they become too weak to continue, or until they are attacked and cannibalised by their healthier siblings. *Penaeus stylirostris* at this stage of infection often have white or buff coloured spots (which differ in appearance and location from the white spots that sometimes occur in shrimp with WSSV infections) in the cuticular epidermis, especially at the junction of the tergal plates of the abdomen, giving such shrimp a mottled appearance. This mottling later fades in moribund *P. stylirostris* and individuals become more bluish. In *P. stylirostris* and *P. monodon* with terminal-phase infection with IHNV, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Lightner *et al.*, 1983).

#### *Infection with IHNV in Penaeus vannamei*

RDS, a chronic form of infection with IHNV, occurs in *P. vannamei*. The severity and prevalence of RDS in infected populations of juvenile or older *P. vannamei* may be related to infection during the larval or early postlarval stages. RDS has also been reported in cultured stocks of *P. stylirostris* and *P. monodon*. Juvenile shrimp with RDS may display a bent (45° to 90° bend to left or right) or otherwise deformed rostrum, a deformed sixth abdominal segment, wrinkled antennal flagella, cuticular roughness, 'bubble-heads', and other cuticular deformities. Populations of juvenile shrimp with RDS display disparate growth with a wide distribution of sizes and many smaller than expected ('runted') shrimp. The coefficient of variation (CV = the standard deviation divided by the mean of different size groups within a population) for populations with RDS is typically greater than 30% and may approach 90%, while populations of juvenile *P. vannamei* and *P. stylirostris* free from infection with IHNV (and thus RDS-free) usually show CVs of 10–30% (Lightner, 1996; Primavera & Quintio, 2000).

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission of IHNV can be by horizontal or vertical. Horizontal transmission has been demonstrated by cannibalism or by contaminated water (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983), and vertical transmission via infected eggs (Motte *et al.*, 2003).

### 2.3.5. Environmental factors

The replication rate of IHNV at high water temperatures was significantly reduced in a study in which viral replication was compared in *P. vannamei* experimentally infected and held at 24°C and 32°C. After a suitable incubation period, shrimp held at 32°C had approximately 10<sup>2</sup> times lower viral load than shrimp held at 24°C (Montgomery-Brock *et al.*, 2007).

### 2.3.6. Geographical distribution

Infection with IHNV has been reported from cultured shrimp in most of the major shrimp-culturing regions of the world including Asia, Oceania, North and South America and the Middle East.

IHNV homologous sequences have been found within the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). These sequences do not represent viral DNA (refer Section 2.1.1 *Aetiological agent*).

See WOA HAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

---

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

None available.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports.

### 2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

### 2.4.4. Breeding resistant strains

Selected stocks of *P. stylirostris* that are resistant to infection with IHNV have been developed and these have had some successful application in shrimp farms (Lightner, 1996). However, lines of *P. stylirostris* bred for resistance to infection with IHNV (Tang *et al.*, 2000) do not have increased resistance to other diseases, such as white spot syndrome virus (WSSV), so their use has been limited. In some stocks a genetic basis for IHNV susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

### 2.4.5. Inactivation methods

IHNV is a stable shrimp virus; infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 2009).

### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

IHNV is transmitted vertically by the transovarian route (Motte *et al.*, 2003). Disinfection of eggs and larvae is good management practice (Chen *et al.*, 1992) that may reduce IHNV contamination of spawned eggs and larvae but is not effective for preventing transovarian transmission of IHNV (Motte *et al.*, 2003).

### 2.4.7. General husbandry

Some husbandry practices have been successful in preventing the spread of IHNV. Among these has been the application of PCR pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Motte *et al.*, 2003), as well as the development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 2005). The latter has proven to be the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with IHNV (Lightner, 2005).

## 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Specimens suitable for testing for infection with IHNV include postlarvae (PL), juveniles and adults. While IHNV may infect all life stages, virus load Infection with IHNV may be below detection limits in spawned eggs and larval stages, so these life stages are not suitable for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHNV.

### 3.2. Selection of organs or tissues

IHNV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissues for IHNV include connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998). Hence, whole shrimp (e.g. larvae or postlarvae) or tissue samples containing the aforementioned target tissues are suitable for most tests using molecular methods.

---

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut or its caeca) are inappropriate samples for detection of IHNV (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998). Shrimp eyes contain PCR inhibitors and their use should be avoided.

### 3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used for testing when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998).

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

### 3.5. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

#### 3.5.1. Samples for pathogen isolation bioassay

The ~~success of pathogen isolation and~~ results of bioassay depend strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

#### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological-molecular techniques can be found in Section B. 2-5-5.5 of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

#### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B. 2-2-5.3 of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

#### 3.5.4. Samples for other tests

Not relevant.

### 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger shrimp should be processed and tested individually. Small life stages such as PL can be pooled to obtain the minimum amount of material for ~~virus isolation or~~ molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- 
- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
  - ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
  - + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
  - Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology						++	++	NA		++	++	NA
Cell culture												
Real-time PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	+	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	±
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						+	+	1		++	++	1
Bioassay					±	±	±	NA				
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods <sup>3</sup>												
Other methods <sup>3</sup>												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction;

LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

#### 4.1. Wet mounts

No reliable methods have been developed for direct microscopic pathology.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

Presumptive acute infections in *P. stylirostris* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stained sections whereas chronic infection are much more difficult to diagnose using these staining methods. For diagnosis of chronic infections and confirmation of acute infections however, the use of molecular methods is required for IHNV detection (e.g. by PCR or application of IHNV-specific DNA probes to dot-blot hybridisation tests or *in-situ* hybridisation [ISH] of histological sections).

Histological demonstration of prominent intranuclear, Cowdry type A inclusion bodies, provides a provisional diagnosis of infection with IHNV. These characteristic IHNV inclusion bodies are eosinophilic and often haloed (with H&E stains of tissues preserved with fixatives that contain acetic acid, such as Davidson's AFA and Bouin's solution) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996), intranuclear inclusion bodies within chromatin-marginated, hypertrophied nuclei of cells in tissues of ectodermal (epidermis, hypodermal epithelium of fore- and hindgut, nerve cord and nerve ganglia) and mesodermal origin (haematopoietic organs, antennal gland, gonads, lymphoid organ, and connective tissue). Intranuclear inclusion bodies caused by infection with IHNV may be easily confused with developing intranuclear inclusion bodies caused by WSSV infection. ISH assay (see Section 4.6 *In-situ hybridisation*) of such sections with a DNA probe specific to IHNV provides a definitive diagnosis of infection with IHNV (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

The use of Davidson's fixative (containing 33% ethyl alcohol [95%], 22% formalin [approximately 37% formaldehyde], 11.5% glacial acetic acid and 33.5% distilled or tap water) is highly recommended for all routine histological studies of shrimp (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). To obtain the best results, dead shrimp should not be used. Only live, moribund, or compromised shrimp should be selected for fixation and histological examination. Selected shrimp are killed by injection of fixative directly into the hepatopancreas; the cuticle over the cephalothorax and abdomen just lateral to the dorsal midline is opened with fine-pointed surgical scissors to enhance fixative penetration (the abdomen may be removed and discarded), the whole shrimp (or cephalothorax) is immersed in fixative for 24 to 48 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol for storage. After transfer to 70% ethyl alcohol, fixed specimens may be transported by wrapping in cloth or a paper towel saturated with 70% ethyl alcohol and packed in leak-proof plastic bags.

#### 4.3. Cell culture for isolation

IHNV has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

##### Extraction of nucleic acids

Numerous different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can should be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances optical density or running a gel.

There are multiple geographical variants of IHNV, some of which are not detected by all of the ~~some~~ available methods. Two primer sets, 392F/R and 389F/R, are the most suitable for detecting all the known genetic variants of IHNV (Tang *et al.*, 2000; 2007). However, these tests also detect non-infectious endogenous viral elements (EVE) within the *P. monodon* genome (previously known as types 3A and 3B), which are inserted into the genome of certain stocks of *P. monodon* from the western Indo-Pacific, East Africa, Australia and India (Saksmerprome *et al.*, 2011; [Taengchaiyaphum \*et al.\*, 2022](#); Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). As these PCR methods may result in positive test results in uninfected *P. monodon*, positive results should be confirmed by a method that detects IHNV but not the IHNV-related EVEs.

PCR primers have been developed that can detect the IHNV sequence but do not amplify IHNV-related EVEs present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprome *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a genomic segment of IHNV types 1 and 2 (the infectious forms of IHNV), but not the non-infectious EVEs within the *P. monodon* genome (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer set MG831F/R reacts only with non-infectious EVEs within the *P. monodon* genome (Tang *et al.*, 2007). Hence, confirmation of unexpected positive or negative PCR results for IHNV with a second primer set, or use of another diagnostic method (i.e. histology, bioassay, ISH) is highly recommended.

#### 4.4.1. Real-time PCR

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Real-time PCR methods have been developed for the detection of IHNV (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). A highly sensitive SYBR Green real-time PCR targeting a segment of the IHNV genome that is considered less susceptible to endogenisation was developed (Encinas-Garcia *et al.*, 2015). More recently, a TaqMan real-time assay capable of differentiating endogenous virus element-EVEs from infectious form of IHNV in *P. monodon* has been reported (Cowley *et al.*, 2018); however, analysis of a *P. monodon* whole genome sequence has identified 100% primer and probe sequence matches to EVEs (Taengchaiyaphum *et al.*, 2022). The real-time PCR method using TaqMan chemistry described in Table 4.4.1 below for IHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

**Table 4.4.1. Primers and probes for real-time PCR detection of IHNV**

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'-3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1* Tang & Lightner, 2001; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266			
IHNV and IHNV- related EVEs	Fwd IHNV1608F: TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A Rev IHNV1688R: GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA	300 nM primers 150 nM probe	40 cycles of: 95°C/1 sec and 60°C/20 sec
non-structural protein	Probe: FAM-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-TAMRA		

**\*NOTE – this method will amplify EVEs within the genome of *P. monodon*. Positive results in this species must be confirmed by a method that does not react with IHNV EVEs.**

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for a non-structural protein. The upstream (IHNV1608F) and downstream (IHNV1688R) primer sequences are: 5' TAC TCC GGA CAC CCA ACC A 3' and 5' GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA 3', respectively. The TaqMan probe (5' ACC AGA CAT AGA GCT ACA ATC CTC GCC TAT TTG 3'), is synthesised and labelled with FAM on the 5' end and TAMRA on the 3' end.
- ii) Preparation of DNA template: DNA extracted from tissues or haemolymph that was preserved in 95% ethanol and then dried. A control consisting of tissues or haemolymph from known negative animals should be included during the DNA extraction step. The DNA can be extracted by a variety of methods. Commercial DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega), or DNazol (Life Technologies). Spectrophotometric readings of the final DNA will indicate the purity of the DNA and the amount of total DNA extracted from the sample.
- iii) The real-time PCR reaction mixture contains: TaqMan Fast virus 1-step Master Mix (Life Technologies, or commercially available equivalent reagents), 0.3 µM of each primers, 0.15 µM of TaqMan probe, 5–50 ng DNA, and water in a reaction volume of 20 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) The cycling profile is: initial denaturation of 20 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 second and annealing/extension at 60°C for 20 seconds.

#### 4.4.2. Conventional PCR

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Several one-step PCR methods (Krabsetsve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2007), and a number of commercial PCR kits are available for IHNV detection. Nested methods are also available. In addition to IHNV, some of these methods will amplify EVEs in *Penaeus monodon*. Positive results in *P. monodon* should be followed up with other methods that will not react with EVEs. In the event that results are ambiguous using the 389F/R 'universal' primer set, it is recommended to use primers from a different region of the genome for confirmatory testing. In this case, that would mean using primers 77012F/77353R or the 392F/R primer sets and follow up with sequencing of PCR amplicons for confirmation.

**Table 4.4.2.1. Recommended primer sets for one-step conventional PCR detection of IHNV**

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
<u>Method 1* Tang <i>et al.</i>, 2007; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 389 bp-product</u>			
<u>IHNV and IHNV-related EVEs</u> <u>Non-structural protein</u>	<u>Fwd 389F: CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA</u> <u>Rev 389R: GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA</u>	<u>200 nM</u>	<u>35 cycles of:</u> <u>94°C/30 sec, 60°C/30 sec,</u> <u>and 72°C/30 sec</u>
<u>Method 2* Nunan <i>et al.</i>, 2000; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 356 bp-product</u>			
<u>IHNV and IHNV-related EVEs</u> <u>Between the non-structural and capsid protein-coding regions</u>	<u>Fwd 77012F: TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A</u> <u>ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA</u> <u>Rev 77353R: GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-TCG-</u> <u>TAC-TGG-CTG-TTC-ATC</u>	<u>1000 nM</u>	<u>35 cycles of:</u> <u>95°C/30 sec, 60°C/30 sec,</u> <u>and 72°C/30 sec</u>
<u>Method 3* Tang <i>et al.</i>, 2000; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 392 bp-product</u>			
<u>IHNV and IHNV-related EVEs</u> <u>Non-structural protein</u>	<u>Fwd 392F: GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA</u> <u>Rev 392R: ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG</u>	<u>300 nM</u>	<u>35 cycles of:</u> <u>95°C/30 sec, 60°C/30 sec,</u> <u>and 72°C/30 sec</u>
<u>Method 4 Tang <i>et al.</i>, 2007; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 309 bp-product</u>			
<u>IHNV ORF1</u>	<u>Fwd 309F: TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A</u> <u>Rev 309R: TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A</u>	<u>200 nM</u>	<u>35 cycles of:</u> <u>94°C/30 sec, 55°C/30 sec,</u> <u>and 72°C/30 sec</u>

**\*NOTE – these methods will amplify EVEs within the genome of *P. monodon*. Positive results in this species must be confirmed by a method that does not react with IHNV EVEs.**

Primer	Product	Sequence (5'–3')	G+C%/Temp.	GenBank & References	Specificity
389F	389 bp	GGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA	50%/72°C	AF218266	All genetic variants of IHNV
389R		GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	and IHNV-related EVEs
77012F	356 bp	ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA	50%/68°C	AF218266	Not given in the reference
77353R		TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC	55%/63°C	(Nunan <i>et al.</i> , 2000)	
392F	392 bp	GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA	50%/68°C	AF218266	All genetic variants of IHNV and IHNV-related EVEs

Primer	Product	Sequence (5'-3')	G+C%/Temp.	GenBank & References	Specificity
392R		ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG	50%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000)	
399F	309 bp	TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A	36%/68°C	AF218266	IHHNV <u>but not</u> IHHNV-related EVEs
399R		TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A	40%/69°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	
MG831F	831 bp	TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT	45%/58°C	DQ228358	IHHNV-related EVEs <u>but not</u> IHHNV
MG831R		GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT	55%/62°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	

NOTE: Primers 389F/R and 392F/R described above are from the nonstructural protein coding region of the IHHNV genome. Primers 77012F/77353R are from a region in between the nonstructural and capsid protein coding region of the genome. In the event that results are ambiguous using the 389F/R 'universal' primer set, it is recommended to use primers from a different region of the genome for confirmatory testing. In this case, that would mean using primers 77012F/77353R or the 392F/R primer sets and follow up with sequencing of PCR amplicons for confirmation.

General PCR method for IHHNV: the PCR method described below for IHHNV generally follows the methods outlined in Tang *et al.* (2007) and Nunan *et al.* (2000). However, recent minor modifications including the sources of the reagents and the use of an automated DNA extraction instrument are acceptable. The modifications include DNA extraction method, choice of primers (Table 4.4.2.1), and the volume of reaction. These slightly modified methods have been validated in accordance with Chapter 1.1.2 *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases* and do not affect the diagnostic performance of the assay.

- i) Use as a template, the extraction of DNA templates is the same as that described above. Use 1–5 µl of extracted DNA as a template per 25 µl reaction volume.
- ii) The following controls should be included in every PCR assay for IHHNV: (a) DNA from a known negative tissue sample; (b) DNA from a known positive sample (either from tissue or haemolymph or from a plasmid clone that contains the fragment that the specific set of primers amplifies; and (c) a 'no template' control.
- iii) Use as primers, primers 389F and 389R, which elicit a band 389 bp in size from IHHNV-infected material, or primers 77012F and 77353R, which elicit a band 356 bp in size from IHHNV-infected material. Prepare primers at 10 µM in distilled water.
- iv) If PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) are used, the PCR profile involves a 3–5 minutes at 95°C to denature DNA followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and final extension at 72°C for 5 minutes.
- v) Prepare a 'Master Mix' consisting of water and primers.
- vi) For a 25 µl reaction mix, add 24 µl Master Mix to each tube and then add 1 µl of the DNA template to be tested.
- vii) Vortex each tube, spin quickly to bring down all liquid. Insert tubes into the thermal cycler and start the PCR program.
- viii) After PCR, run 6–10 µl of the sample in a 1.5% agarose gel (containing SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent to stain the DNA). Look for the 389 bp band (if using primers 389F and 389R) or for the 356 bp band (if using primers 77012F and 77353R). Bands are not always seen, as it is necessary to have at least 10 ng DNA µl<sup>-1</sup> to see DNA in a gel. A direct sequencing of amplified products can be performed through gel extraction of a PCR band with correct size and the sequencing primer(s) used for amplification to confirm the presence of IHHNV.

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays and a real-time isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) assay are available to detect and confirm IHHNV infection have been published (Arunrut *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2015), however, they are currently not recommended as they are not sufficiently validated.

---

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands must be sequenced and analysed and compared with published in comparison with reference sequences.

PCR products may be directly sequenced or cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHNV, to identify false positives or nonspecific amplification, or to distinguish the amplified products from the infectious form of the virus and demonstrate the presence of the non-infectious IHNV-related EVEs in the host genome (Tang & Lightner, 2006).

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

Direct detection methods using DNA probes specific for IHNV are available in dot-blot and ISH formats. The ISH method uses a DIG-labelled DNA probe for IHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996).

Gene probe and PCR methods provide greater diagnostic specificity and sensitivity than traditional techniques that employ classic histological approaches. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp. A haemolymph sample may be taken with a tuberculin syringe, or an appendage (a pleopod for example) may be biopsied (Bell *et al.*, 1990), and used as the sample for a dot-blot hybridisation test.

#### 4.7. Immunohistochemistry

Not relevant.

#### 4.8. Bioassay

If SPF shrimp are available, the following bioassay method is based on Tang *et al.* (2000), is suitable for IHNV diagnosis.

- i) For bioassay, feed the minced shrimp tissue suspected of being infected with IHNV to the indicator shrimp species (e.g. SPF *P. vannamei* and *P. stylirostris* at the PLs or juvenile stage) at 10% of their body weight twice daily for 1 days.
- ii) For the following, the indicator shrimp were maintained on a pelletised ration.
- iii) Examine moribund shrimp grossly or by using the methods described above. There may be no apparent mortality during the experimental period.
- iv) If at 30 days after feeding there are still no moribund shrimp and all **molecular** test results are negative, then it is safe to conclude that the bioassay results are negative.

Known IHNV positive and negative control groups should be included in the bioassay.

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

None has been successfully developed.

#### 4.10. Other methods

Not available.

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Conventional PCR and/or real-time PCR are the recommended test for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHNV in apparently healthy populations as described in Sections 4.4.1 and 4.4.2.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

---

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status <sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical-Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with IHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by conventional PCR
- ii) Positive result by real-time PCR

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with IHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criterion criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and a positive result by conventional PCR ~~targeting non-overlapping regions of the viral genome and followed by~~ amplicon sequencing

~~Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.~~

## 6.2. Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with IHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Histopathology consistent with IHNV infection
- iii) Positive result by conventional PCR
- iii iv) Positive result by real-time PCR
- iv) ~~Histopathology consistent with IHNV infection~~
- v) Positive result by *in-situ* hybridisation
- vi) Positive result by bioassay

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with IHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and a positive result by conventional PCR targeting non-overlapping regions of the viral genome and followed by amplicon sequencing
- ii) ~~Histopathology consistent with IHNV infection coupled with A positive result by in-situ hybridisation and detection of IHNV~~ a positive result by real-time PCR
- iii) ~~Histopathology consistent with IHNV infection coupled with A positive result by in-situ hybridisation and detection of IHNV~~ by a positive result by conventional PCR and followed by amplicon sequencing

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with IHNV is provided in Table 6.3.1 (none no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with IHNV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

#### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study, PCR: = polymerase chain reaction.

#### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study, PCR: = polymerase chain reaction.

## 7. References

ALY S.M., MANSOUR S.M., THABET R.Y. & MABROK M. (2021). Studies on infectious myonecrosis virus (IMNV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. *Dis. Aquat. Org.*, **143**, 57–67.

ARANGUREN CARO L.F., GOMEZ-SANCHEZ M.M., PIEDRAHITA Y., MAL H.N., CRUZ-FLORES R., ALENTON R.R.R. & DHAR A.K. (2022). Current status of infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the Peruvian and Ecuadorian shrimp industry. *PLoS One*, **17**(8):e0272456. doi: 10.1371/journal.pone.0272456.

ARUNRUT N., PROMBUN P., SAKSMERPROME V., FLEGEL T. W. & KIATPATHOMCHAI W. (2011). Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods*, **171**, 21–25.

- 
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.
- CHAYABURAKUL K., LIGHTNER D.V., SRIURAIRATTANA S., NELSON K.T. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2005). Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 191–200.
- CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- COWLEY J.A., RAO M., COMAN G.J. & COWLEY J. (2018). Real-time PCR tests to specifically detect Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) lineages and an IHHNV endogenous viral element (EVE) integrated in the genome of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Dis. Aquat. Org.*, **129**, 145–158.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.
- ENCINAS-GARCIA T., MENDOZA-CANO F., ENRÍQUEZ-ESPINOZA T., LUKEN-VEGA L., VICHIDO-CHÁVEZ R. & SÁNCHEZ-PAZ A. (2015). An improved validated SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for the detection of the *Penaeus stylirostris* densovirus in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **212**, 53–58.
- FERNANDO M.C., ENRIQUEZ-ESPINOZA T., VALENZUELA-CASTILLO A., ENCINAS-GARCIA T. & SANCHEZ-PAZ A. (2016). High Occurrence of the Decapod Penstylid densovirus (PstDV1) Detected in Postlarvae of *Penaeus vannamei* Produced in Commercial Hatcheries of Mexico. *EcoHealth*. **13**, 591–596.
- JAGADEESAN V., EZHIL PRAVEENA P., OTTA S.K. & JITHENDRAN K.P. (2019). Classical runt deformity syndrome cases in farmed *Penaeus vannamei* along the east coast of India. In: BRAQCON 2019: World Brackishwater Aquaculture Conference, Jithendran K.P., Saraswathy R., Balasubramanian C.P., Kumaraguru Vasagam K.P., Jayasankar V., Raghavan R., Alavandi S.V. & Vijayan K.K., eds. Journal of Coastal Research, Special Issue No. 86, pp. 107–111. Coconut Creek (Florida), ISSN 0749-0208.
- KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.*, **22**, 235–243.
- KRABETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.* **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHNV virus of penaeid shrimp. *J. World Aquac. Soc.*, **18**, 196–197.
-

- 
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. In: Shellfish Safety and Quality, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.
- MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B., & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.
- MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.
- NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquacult. Soc.*, **32**, 330–334.
- PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT K.H. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHHN parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.
- PENZES J.J., SODERLUND-VENERMO M., CANUTI M., EIS-HUBINGER A.M., HUGHES J., COTMORE S.F. & HARRACH B. (2020). Reorganizing the family *Parvoviridae*: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch. Virol.*, **165**, 2133–2146. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>
- PRIMAVERA, J.H. & QUINITIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crust. Biol.*, **20**, 796–802.
- SAKSMERPROME V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160**, 180–190.
- SELLARS M.J., COWLEY J.A., MUSSON D., RAO M., MENZIES M.L., COMAN G. J. & MURPHY B.S. (2019). Reduced growth performance of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Aquaculture*, **499**, 160–166.
- SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevidensovirus. *Virology*, **277**, 167–177.
- SUN Z.F., HU C. Q., REN C. H. & SHEN Q. (2006). Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **131**, 41–46.
- TAENGCHAIYAPHUM S., BUATHONGKAM P., SUKTHAWORN S., WONGKHALUANG P., SRITUNYALUCKSANA K. & FLEGEL T.W. (2021). Shrimp Parvovirus Circular DNA Fragments Arise From Both Endogenous Viral Elements and the Infecting Virus. *Front. Immunol.*, **12**, 729528. doi: 10.3389/fimmu.2021.729528.
-

---

TAENGCHAIYAPHUM S., WONGKHALUANG P., SITTIKANKAEW K., KAROONUTHAISIRI N., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2022). Shrimp genome sequence contains independent clusters of ancient and current Endogenous Viral Elements (EVE) of the parvovirus IHNV. *BMC Genomics*, **23**, 565. doi: 10.1186/s12864-022-08802-3.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.

TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH H.H. & LIGHTNER D.V. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.

~~WEI Y.W., FAN D.D. & CHEN J. (2017). The mussel *Mytilus edulis* L. as an important reservoir of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Aquaculture Res.*, **48**, 1346–1350.~~

XIA X.X., YU Y.X., HU L.H., MANFRED W. & PAN Y.J. (2015). Rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) by real-time, isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Arch. Virol.*, **160**, 987–994.

\*  
\* \*

**NB:** There are WOA Reference Laboratories for infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (please consult the WOA web site for the most up-to-date list:

<http://www.woah.org/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus

**NB:** FIRST ADOPTED IN 1995 AS INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATPOIETIC NECROSIS;  
MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

CHAPTER 2.2.5.

INFECTION WITH  
INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS

---

1. Scope

Infection with infectious myonecrosis virus means infection with the pathogenic agent infectious myonecrosis virus (IMNV) that is tentatively assigned to the Family *Totiviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

~~Phylogenetic analysis of its RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene coding sequence indicates that IMNV is most closely related to *Giardia lamblia virus*, tentatively assigned to the family *Totiviridae*—a member of the family *Totiviridae* (Fauquet *et al.*, 2005; Lightner, 2011; Nibert, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Wickner *et al.*, 2011).~~

IMNV particles are icosahedral in shape and 40 nm in diameter, with a buoyant density of 1.366 g ml<sup>-1</sup> in caesium chloride. The genome consists of a single, double-stranded (ds) RNA molecule of 8226–8230 bp (Loy *et al.*, 2015; Naim *et al.*, 2015). Sequencing of the viral genome reveals two non-overlapping open reading frames (ORFs). The first ORF (ORF1, 470–5596 nt) encodes a putative RNA-binding protein and a capsid protein. The coding region of the RNA-binding protein is located in the first half of ORF1 and contains a dsRNA-binding motif in the first 60 amino acids. The second half of ORF1 encodes a capsid protein, as determined by amino acid sequencing, with a molecular mass of 106 kDa. The second ORF (ORF2, 5884–8133 nt) encodes a putative RdRp (Poulos *et al.*, 2006). The most variable region of IMNV genome is located in the first half of ORF1, coinciding with a region which probably encodes the capsid protrusions (Dantas *et al.*, 2015).

The complete genomes of IMNV types originating from Brazil and Indonesia have been sequenced and found to be 99.6% identical at the nucleotide level (Poulos *et al.*, 2006; Senapin *et al.*, 2007). The 99.6% full genome sequence identity (and anecdotal information on the introduction of *Penaeus vannamei* stocks from Brazil) indicate that the disease was introduced from Brazil to Indonesia in 2006. A new genotype was analysed in infected samples in 2018 in Indonesia, including an isolate that contains a deletion of 622 amino acids (Mai *et al.*, 2019).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

No data.

2.1.3. Survival and stability outside the host

No information available.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

---

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IMNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: brown tiger prawn (*Penaeus esculentus*), banana prawn (*P. merguensis*), and whiteleg shrimp (*P. vannamei*).

#### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IMNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and blue shrimp (*P. stylirostris*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: southern brown shrimp (*P. subtilis*).

#### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Juveniles and subadults of *P. vannamei*, farmed in marine, brackish, and low salinity brackish water, appear to be most severely affected by infection with IMNV (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

#### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The principal target tissues for IMNV include the striated muscles (skeletal and less often cardiac), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005).

#### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of populations of *P. vannamei* that survive IMNV infections or epizootics may carry the virus.

#### 2.2.6. Vectors

Experimental studies have demonstrated that brine shrimp *Artemia franciscana* can act as a vector for IMNV (da Silva *et al.*, 2015).

### 2.3. Disease pattern

#### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

In early juvenile, juvenile, or adult *P. vannamei* in regions where infection with IMNV is enzootic, outbreaks of IMNV infections associated with sudden high morbidity and mortality may follow 'stress' events such as capture by cast-netting, feeding and sudden changes in water salinity or temperature (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). Feed conversion ratios of affected populations can increase from a normal value of ~ 1.5 up to 4.0 or higher (Andrade *et al.*, 2007). Mortalities from infection with IMNV can range from 40% to 70% in cultivated *P. vannamei*.

In regions where infection with IMNV is enzootic in farmed stocks of *P. vannamei*, its prevalence may reach 100% (Andrade *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2004).

#### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Affected shrimp present with visibly white tails. Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut. High mortality can occur suddenly and continue for several days. A sudden onset of clinical signs may have a sudden onset occur following stress events (e.g. capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity).

Only shrimp in the acute phase of disease present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp become lethargic during or soon after stress events such as capture by cast-netting, feeding, sudden changes in water temperature, sudden reductions in water salinity, etc.

#### 2.3.3 Gross pathology

---

Shrimp in the acute phase of disease present focal-to-extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some individual shrimp.

Exposing the paired lymphoid organs (LO) by simple dissection will show that they are hypertrophied (3–4 times their normal size) (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

#### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

IMNV has been demonstrated to be transmitted horizontally by cannibalism (Lightner, 2011; Poulos *et al.*, 2006). Transmission via water probably occurs. Although vertical transmission is suspected from anecdotal evidence, it is not known whether this occurs via transovarial mechanism or by surface contamination of newly spawned eggs.

#### 2.3.5. Environmental factors

Temperature and salinity effects are likely predisposing factors to disease outbreaks, but no experimental data are available (Nunes *et al.*, 2004).

#### 2.3.6. Geographical distribution

Infection with IMNV has been reported to occur in some countries in the Americas, Asia and Africa (Aly *et al.*, 2021; Andrade *et al.*, 2007; Lightner *et al.*, 2004; Naim *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Sahul *et al.*, 2017).

See WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

### 2.4. Biosecurity and disease control strategies

#### 2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for infection with IMNV are available.

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Ctn[15-34], a cathelicidin-derived eicosapeptide was found to demonstrate antiviral activity against IMNV in primary haemocyte cultures (Vieira-Girao *et al.*, 2017).

#### 2.4.3. Immunostimulation

No data.

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

There are anecdotal reports of some selected lines of *P. vannamei* having better survival and culture performance in farms where infection with IMNV is enzootic. During a 20-day controlled laboratory study in which the shrimp were challenged with IMNV, some domesticated lines of *P. vannamei* were found to survive better than other lines (White-Noble *et al.*, 2010).

*Penaeus monodon* and *P. stylirostris*, for which there is incomplete evidence of susceptibility (see section 2.2.2), are considered to be more resistant to infection with IMNV than *P. vannamei* (Tang *et al.*, 2005).

#### 2.4.5. Inactivation methods

No data.

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

While IMNV is believed to be transmitted vertically, there are no scientific data confirming this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is a good management practice recommended to reduce the potential for transmission of a number of penaeid shrimp diseases from female spawners to their eggs or larvae, and the practice may reduce IMNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

---

#### 2.4.7. General husbandry

Management practices in endemic areas principally involves exclusion of IMNV from shrimp farms. Broodstock or their spawned eggs or nauplii are PCR-tested and those that test positive are discarded (Andrade *et al.*, 2007). Following and restocking of affected farms or entire culture regions with IMNV-free stocks of *P. vannamei* most suited to local culture conditions has proven to be the most successful for preventing and controlling other virus diseases of shrimp, and should be applicable to control and prevent infection with IMNV (Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Moss & Moss, 2009).

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Specimens suitable for testing for infection with IMNV using molecular methods (e.g. RT-PCR, nested RT-PCR, real-time RT-PCR, etc.) include postlarvae (PL), juveniles, subadults and adults. While IMNV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in larval stages, so these life stages may not be suitable for demonstrating freedom from infection with IMNV unless validated for those life stages.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

IMNV infects tissues of mesodermal origin. The principal target tissues in the acute phase of infection with IMNV are the striated muscles (skeletal and less commonly cardiac muscle), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ tubule parenchymal cells. In chronic infections, the lymphoid organ may be the principal target tissue.

#### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

IMNV replicates systemically but does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of IMNV infection.

#### 3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

#### 3.5. Preservation of samples for submission

Several factors can affect specimen quality during collection, handling and storage, such as exposure to light, heat, desiccation, and incomplete preservation. Hence, standard operating protocols or recommended practices should be followed at all steps of the diagnostic process.

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

##### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

Not applicable.

##### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples (pleopods, cephalothorax, muscle, haemolymph) for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen.

---

### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B.2.2 of Chapter 2.3.0 *General information* (diseases of fish).

### 3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

## 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger shrimp should be processed and tested individually. Small life stages such as PL or fry can be pooled to obtain the minimum amount of material for molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
++ =	Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
+ =	Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts					+	+	+	±				
Histopathology					++	++	++	2				
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+	++	++	1	++	++	++	2	++	++	++	2
Conventional RT-PCR	+	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods												
Other methods												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

#### 4.1. Wet mounts

Stained or unstained tissue squashes of affected skeletal muscle or of the LO may show abnormalities. Tissue squashes of skeletal muscle when examined with phase or reduced light microscopy may show loss of the normal striations. Fragmentation of muscle fibres may also be apparent. Squashes of the LO may show the presence of significant accumulations of spherical masses of cells called lymphoid organ spheroids (LOS) amongst normal LO tubules.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

Infection with IMNV in the acute and chronic phases can be presumptively diagnosed using histology (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). However, the lesions in striated muscles and LO are not pathognomonic for infection with IMNV. White tail disease of penaeid shrimp caused by the *P. vannamei* nodavirus (PvNV) can mimic infection with IMNV (Tang *et al.*, 2007).

Haematoxylin and eosin stained tissue sections from shrimp with acute-phase infection with IMNV present myonecrosis with characteristic coagulative necrosis of striated (skeletal) muscle fibres, often with marked oedema among affected muscle fibres. Some shrimp may present a mix of acute and older lesions. The affected muscle fibres appear to progress from presenting coagulative necrosis to liquefactive necrosis, which is accompanied by moderate infiltration and accumulation of haemocytes. In the most advanced lesions, haemocytes and inflamed muscle fibres are replaced by a loose matrix of fibrocytes and connective tissue fibres that are interspersed with haemocytes and foci of (presumed) regenerating muscle fibres (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

Significant hypertrophy of the LO caused by accumulations of LOS is a highly consistent lesion in shrimp with acute or chronic-phase infection with IMNV lesions. Often, many ectopic LOS are found in other tissues not near the main body of the LO. Common locations for ectopic LOS include the haemocoelom in the gills, heart, near the antennal gland tubules, and ventral nerve cord (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

#### 4.3. Cell culture for isolation

No crustacean cell lines exist, but IMNV was observed to propagate in C6/36 subclone of *Aedes albopictus* cell line (Kumar *et al.*, 2020). Performance of the test should be confirmed before being recommended.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

##### *Extraction of nucleic acids*

~~Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.~~

Published methods are available for the molecular detection of IMNV by *in-situ* hybridisation (ISH), nested RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005). A nested RT-PCR kit for detection of the virus is available commercially.

##### 4.4.1. Real-time RT-PCR

A real-time RT-PCR method was developed to detect and quantify IMNV in shrimp tissue. The method which can detect as few as 10 IMNV RNA copies  $\mu\text{l}^{-1}$  total RNA (Andrade *et al.*, 2007) is summarised below.

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
------------------------	----------------------	---------------	--------------------

Method 1: Andrade <i>et al.</i> , 2007; GenBank Accession No.: AY570982			
IMNV Capsid protein gene	Fwd IMNV412F: GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-GCA Rev IMNV545R: AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT Probe: CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG	300 Nm 200 nM	40 cycles of: 95°C/3 sec and 60°C/30 sec

#### 4.4.2. Conventional PCR

The nested RT-PCR method to detect IMNV uses two PCR primer sets that produce a 328 bp one-step amplicon and 139 bp two-step amplicon. The 1-step PCR can detect as little as 100 IMNV RNA copies and the 2-step PCR can detect in the order of 10 IMNV RNA copies (Poulos & Lightner, 2006).

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Poulos & Lightner, 2006; GenBank Accession No.: KJ636783.2; amplicon size: 328/139 bp			
IMNV Capsid protein gene (nested-PCR)	<u>Outer-Primary</u> Fwd 4587F: CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA Rev 4914R: ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT	200 nM	45 cycles of: 95°C/45 sec; 60°C/45 sec; 60°C/7 min
	<u>Inner-Nested</u> Fwd 4725 NF: GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA Rev 4863 NR: AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G	620 nM	39 cycles of: 95°C/30 sec, 65°C/30 sec, 72°C/30 sec; 72°C/2 min

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None.

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

##### *DNA probe for ISH detection of IMNV*

A cDNA library was generated from RNA extracted from purified IMNV. A IMNV-specific ISH DNA probe is prepared from clone IMNV-317 by PCR labelling with digoxigenin-11-dUTP (DIG). The PCR primers used for amplification of the 993 bp probe are IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') and IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3'). Following PCR, the DIG-labelled DNA probe is precipitated with ethanol, re-suspended in water and stored at -20°C until used. The ISH procedure for detecting IMNV follows that outlined by Tang *et al.* (2005). Negative and positive controls should be sourced from PCR-confirmed uninfected and infected shrimp, respectively.

#### 4.7. Immunohistochemistry

Monoclonal antibodies have been generated using recombinant IMNV capsid protein fragments to immunise mice (Kunanopparat *et al.*, 2011). Immunohistochemical analysis demonstrated strong reactivity in muscle, gill, heart, LO and connective tissue derived from IMNV-infected *P. vannamei* similar to that demonstrated by *in-situ* hybridisation (Tang *et al.*, 2005). There was no cross-reactivity to tissues derived from uninfected shrimp or shrimp infected with other viral pathogens such as WSSV, YHV, TSV among others.

#### 4.8. Bioassay

---

Not applicable.

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

None are recommended, however an immunochromatographic strip test has been developed (Chaivisuthangkura *et al.*, 2013) using the monoclonal antibodies developed by Kunanopparat *et al.* (2011). While the test is simple, fast and low-cost it is approximately 300-fold less sensitive than one-step RT-PCR (Chaivisuthangkura *et al.*, 2013).

#### 4.10. Other methods

A chromatographic method for detection of PCR amplicons has been developed (Koiwai *et al.*, 2018).

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time RT-PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with IMNV in apparently healthy populations as described in Section 4.1.1.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. ~~It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free. There are currently no WOA Reference Laboratories designated for IMN.~~

#### 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

##### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with IMNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- ~~i) Histopathology consistent with the presence of the pathogen or the disease~~
- i) Positive result by real-time RT-PCR
- ii) Positive result by conventional RT-PCR

##### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with IMNV is considered to be confirmed if ~~at least one of the following criterion criteria~~ is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR and positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

- ~~ii) Histopathology consistent with IMNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IMNV in a tissue sample by real-time RT-PCR~~
- ~~ii) Histopathology consistent with IMNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IMNV in a tissue sample by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing~~

## 6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with IMNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Positive result by conventional RT-PCR
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Histopathology consistent with the presence of the pathogen or the disease

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with IMNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR
- iii) Positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

## 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with IMNV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with IMNV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Real-time PCR	Diagnosis	Experimentally infected SPF <i>P. vannamei</i>	abdominal muscle	<i>P. vannamei</i>	100 ( <u>n=30</u> )	100 ( <u>n=30</u> )	Histopathology	Andrade <i>et al.</i> (2007)

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,  
PCR: = polymerase chain reaction.

### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
-----------	--------------	--------------------	------------------------	---------	---------	---------	----------------	----------

Real-time PCR								
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity,  $n$  = number of samples used in the study, PCR: = polymerase chain reaction.

## 7. References

- ALY S.M., MANSOUR S.M., THABET R.Y. & MABROK M. (2021). Studies on infectious myonecrosis virus (IMNV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. *Dis. Aquat. Org.*, **143**, 57–67. doi: 10.3354/dao03556. PMID: 33570040.
- ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, **264**, 9–15.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 114 p.
- CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., WANGMAN P., LONGYANT S. & SITHIGORNUL P. (2013). Simple and rapid detection of infectious myonecrosis virus using an immunochromatographic strip test. *Arch Virol.*, **158**, 1925–1930.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- DANTAS M.D., CHAVANTE S.F., TEIXEIRA D.I., LIMA J.P. & LANZA D.C. (2015). Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). *Virus Res.*, **20**, 66–71. doi: 10.1016/j.virusres.2015.03.015. Epub 2015 Apr 4. PMID: 25849112.
- DA SILVA S.M.B.C., LAVANDER H.D., DE SANATANA LUNA M.M., DA SILVA A.O.M.E., GALVEZ A.O. & COIMBRA M.R.M. (2015). *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. *J. Invertebr. Pathol.*, **126**, 1–5.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A., EDITORS (2005). Totiviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier, San Francisco, USA, pp. 571–580.
- KOIWAI K., KODERA T., THAWONSUWAN J., RIANI S., KAWASE M., KONDO H. & HIRONO I. (2018). Rapid diagnosis of three shrimp RNA viruses using RT-PCR-DNA chromatography. *J. Fish Dis.*, 2018 May 28. doi: 10.1111/jfd.12821. Epub ahead of print. PMID: 29806113.
- KUNANOPPARAT A., CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., LONGYANY S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL T.W. & SITHIGORNGUL P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, **171**, 141–148.
- LEE C.S. & O'BRYEN P.J., EDITORS (2003). *Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, **106**, 110–130.

- 
- LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.F.J., REDMAN R.M., PASOS DE ANDRADE T. & BONAMI J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 85.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384–424.
- LOY D.S., LIU S., MOGLER M.A., LOY D.J., BLITVICH B.J. & BARTHOLOMAY L.C. (2015). Characterization of newly revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. *J. Gen. Virol.*, 96 (Pt 7), 1821–1819.
- MAI H.N., HANGGONO B., CARO L.F.A., KOMARUDDIN U., NUR'AINI Y.L. & DHAR A.K. (2019). Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) genotypes associated with disease outbreaks on *Penaeus vannamei* shrimp farms in Indonesia. *Arch. Virol.*, **164**, 3051–3057. doi: 10.1007/s00705-019-04408-5. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31531743.
- MOSS S.M. & MOSS D.R. (2009). Chapter 17: Selective breeding of penaeid shrimp. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 425–452.
- NAIM S., BROWN J.K. & NIBERT M.L. (2014). Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Res.*, **189**, 99–105.
- NAIM S., TANG K.F.J., YANG M., LIGHTNER D.V. & NIBERT M.L. (2015). Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. *Arch. Virol.*, **160**, 1579–1583.
- NIBERT M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1315–1318.
- NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, **83**, 37–51 (in Portuguese).
- POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 69–72.
- POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **87**, 987–996.
- SAHUL HAMEED A.S., ABDUL MAJEED S., VIMAL S., MADAN N., RAJKUMAR T., SANTHOSHKUMAR S. & SIVAKUMAR S. (2017). Studies on the occurrence of infectious myonecrosis virus in pond-reared *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. *J. Fish Dis.*, **40**, 1823–1830. doi: 10.1111/jfd.12655. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28631825
- SANTHOSH KUMAR S., SIVAKUMAR S., ABDUL MAJEED S., VIMAL S., TAJU G. & SAHUL HAMEED A.S. (2021). *In vitro* propagation of infectious myonecrosis virus in C6/36 mosquito cell line. *J. Fish Dis.*, **44**, 987–992. doi: 10.1111/jfd.13359. Epub 2021 Feb 25. PMID: 33631045.
- SENAPIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, **266**, 32–38.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 261–265.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 183–190.
-

---

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.

VIEIRA-GIRÃO P.R.N., FALCÃO C.B., ROCHA I.R.C.B., LUCENA H.M.R., COSTA F.H.F. & RÁDIS-BAPTISTA G. (2017). Antiviral Activity of Ctn[15–34], A Cathelicidin-Derived Eicosapeptide, Against Infectious Myonecrosis Virus in *Litopenaeus vannamei* Primary Hemocyte Cultures. *Food Environ. Virol.*, **9**, 277–286. doi: 10.1007/s12560-017-9285-5. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28210987.

WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 71–73.

Wickner R.B., Ghabrial S.A., Nibert M.L., Patterson J.L. & Wang C.C. (2011). Totiviridae. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Elsevier, San Diego, USA.

\*  
\* \*

**NB:** At the time of publication (2022) there was no WOA Reference Laboratory for infection with infectious myonecrosis virus (please consult the WOA web site: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

**NB:** FIRST ADOPTED IN 2009. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.7.

INFECTION WITH TAURA SYNDROME VIRUS

---

1. Scope

Infection with Taura syndrome virus means infection with the pathogenic agent Taura syndrome virus (TSV), Genus Aparavirus, Family *Dicistroviridae*, Order Picornavirales.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

TSV was described as the cause of the disease commonly known as Taura syndrome by Hasson *et al.* (1995), Bonami *et al.* (1997) and Mari *et al.* (1998; 2002). At least four genotypes (strains) of TSV have been documented based on the gene sequence encoding VP1 the largest and presumably dominant of the three major structural proteins of the virus. Based on VP1 sequence variations, these genotypic groups are: 1) the Americas group; 2) the South-East Asian group; 3) the Belize group; and 4) the Venezuelan group (Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

At least two distinct antigenic variants of TSV have been identified by their differential reactivity to monoclonal antibody MAb 1A1, produced using a reference isolate from the Americas (TSV USA-HI94 – GenBank AF277675) (Poulos *et al.*, 1999) as the immunogen: Type A represents those that react with MAb 1A1 (in the enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], Western blots and immunohistochemistry (IHC) with infected tissues) and those that do not were subdivided into Type B (TSV 98 Sinaloa, Mexico) and Type C (TSV 02 Belize), based on host species and virulence. All TSV isolates of the Americas and most, if not all, South-East Asian genotypes react with MAb 1A1. In marked contrast, none of the Belize genotype group reacts with MAb 1A1 (Robles-Sikisaka *et al.*, 2002), nor does a TSV isolate from the 2005 epizootic in Venezuelan shrimp farms.

TSV particles are 32 nm in diameter, non-enveloped icosahedrons and have a buoyant density of 1.338 g ml<sup>-1</sup> in CsCl. The genome of TSV consists of a linear, positive-sense single-stranded RNA 10,205 nucleotides in length, excluding the 3' poly-A tail, and it contains two large open reading frames (ORFs). ORF 1 contains the sequence motifs for non-structural proteins, such as helicase, protease and RNA-dependent RNA polymerase. ORF 2 contains the sequences for TSV structural proteins, including the three major capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (55, 40, and 24 kDa, respectively). The virus replicates in the cytoplasm of host cells (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

*Other reported causes of Taura syndrome:* TS in Ecuador was initially linked to fungicide contamination of shrimp farms, a contention that was supported by litigation for ~16 years after the disease was scientifically shown to have a viral aetiology (Brock *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995). Hence, several papers in the literature propose a toxic aetiology for TS (Intriago *et al.*, 1997; Jimenez, 1992; Jimenez *et al.*, 2000).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

No information available.

2.1.3. Survival and stability outside the host

No information available.

2.2. Host factors

---

### 2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with TSV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), and whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*).

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with TSV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*), giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), the copepod *Ergasilus manicatus*, and the barnacles *Chelonibia patula* and *Octolasmis muelleri*. Evidence is lacking for these species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is TSV, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: blue crab (*Callinectes sapidus*), the crabs *Uca vocans* and *Sesarma mederi*, gulf killifish (*Fundulus grandis*), Indo-Pacific swamp crab (*Scylla serrata*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*) and southern white shrimp (*P. schmitti*).

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Infection with TSV has been documented in all life stages (i.e. post-larvae [PL], juveniles and adults) of *P. vannamei* except eggs, zygotes and larvae (Lightner, 1996a).

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Using injection and *per os* challenge experiments, Nunan *et al.* (2004) demonstrated TSV could be detected in different body parts including gills, head, whole tail, tail muscle, pleopod and tail fan (Nunan *et al.*, 2004). While there was no significant difference in the viral copy number contained in different body parts when TSV was administered via injection, there was a statistically significant difference between tail/gills, tail/head, tail/tail fan, whole tail/tail fan and pleopods/tail fan when the viral inoculum was administered *per os*. The tail samples had the lower viral copy numbers, as did the whole tail and pleopods when compared to the tail fan (Nunan *et al.*, 2004).

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Not demonstrated unequivocally

### 2.2.6. Vectors

*Sea birds*: TSV has been demonstrated to remain infectious for up to 48 hours (after ingestion of TSV-infected shrimp carcasses) in the faeces passed by wild or captive sea gulls (*Larus atricilla*) and chickens (*Gallus gallus*, used as a laboratory surrogate for all shrimp-eating birds) thus suggesting that the virus can retain infectivity when passed through the gastrointestinal system of any bird species. These findings implicate birds as being an important mechanical vector for the transmission of the virus within affected farms or farming regions (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

*Aquatic insects*: the water boatman (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], an aquatic insect that feeds on shrimp carcasses in shrimp farm ponds) have been demonstrated to transport TSV within their intestinal contents, but are not directly infected by the virus (Brock, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; reviewed in Dhar *et al.*, 2004).

## 2.3. Disease pattern

Infection with TSV is best known as a disease of nursery- or grow-out-phase *P. vannamei* that occurs within ~14–40 days of stocking PLs into grow-out ponds or tanks, hence, shrimp with TSV infection are typically small (~0.05 g to <5 g) juveniles. Larger shrimp may also be affected, especially if they are not exposed to the virus until they are larger juveniles or adults (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz, 1997).

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

---

At the farm level, outbreaks of infection with TSV involving stocks of *P. vannamei* (the principal host species for infection with TSV) not selected for resistance, typical cumulative mortalities range from 40 to >90% in cultured populations of PL, juvenile, and subadult life stages. TSV-resistant lines of *P. vannamei* are available which show survival rates of up to 100% in laboratory challenge with all four TSV genotypes (Lightner *et al.*, 2009).

In regions where the virus is enzootic in farmed stocks, the prevalence of infection with TSV has been found in various surveys to range from 0 to 100% (Brock, 1997; Jimenez *et al.*, 2000).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Only acute-phase clinical infection with TSV can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute-phase clinical infection with TSV.

Only shrimp with acute-phase clinical infection with TSV present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp apparently become hypoxic and move to the pond edges or pond surface where dissolved oxygen levels are higher. Such shrimp may attract seabirds in large numbers. In many disease outbreaks, it is the large numbers of seabirds attracted to the moribund shrimp that first indicates the presence of a serious disease outbreak (which is often either infection with TSV or white spot syndrome virus) to the farm manager.

### 2.3.3. Gross pathology

Infection with TSV has three distinct phases, acute, transition, and chronic, which are grossly distinguishable (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1995). Gross signs presented by juvenile, subadult and adult shrimp in the transition phase of infection with TSV are unique and provide a suspicion of infection.

*Acute phase:* gross signs displayed by moribund *P. vannamei* with acute-phase infection with TSV include expansion of the red chromatophores giving the affected shrimp a general, overall pale reddish colouration and making the tail fan and pleopods distinctly red; hence 'red tail' disease was one of the names given by farmers when the disease first appeared in Ecuador (Lightner *et al.*, 1995). In such shrimp, close inspection of the cuticular epithelium in thin appendages (such as the edges of the uropods or pleopods) with a ×10 hand lens reveals signs of focal epithelial necrosis. Shrimp showing these gross signs of acute infection with TSV typically have soft shells, an empty gut and are often in the late D stages of the moult cycle. Acutely affected shrimp usually die during ecdysis.

*Transition (recovery) phase:* although only present for a few days during outbreaks of infection with TSV, the gross signs presented by shrimp in the transition phase can provide a suspicion of infection with TSV. During the transition phase (which may be occurring while many shrimp in the affected populations are still in the acute phase and daily mortalities are high), fair to moderate numbers of shrimp in affected ponds show random, multifocal, irregularly shaped melanised cuticular lesions. These melanised spots are haemocyte accumulations indicating the sites of resolving TSV lesions in the cuticular epithelium. Such shrimp may or may not have soft cuticles and red-chromatophore expansion, and may be behaving and feeding normally (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a).

*Chronic phase:* after successfully moulting, shrimp in the transition phase move into the chronic phase of infection with TSV in which persistently infected shrimp show no obvious signs of disease (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1995). However, *P. vannamei* that are chronically infected with TSV may be less resistant to normal environmental stressors (i.e. sudden salinity reductions) than uninfected shrimp.

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Not applicable.

### 2.3.5. Environmental factors

Outbreaks of infection with TSV are more frequent when salinities are below 30 ppt (Jimenez *et al.*, 2000).

### 2.3.6. Geographical distribution

TSV is now widely distributed in the shrimp-farming regions of the Americas, South-East Asia and the Middle East (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2009; Vergel *et al.*, 2019; Yu & Song, 2000).

---

See WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for TSV are available.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

### 2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

### 2.4.4. Breeding resistant strains

After TSV emerged in Ecuador in 1992–1994, *P. stylirostris* were found that possessed resistance to infection with TSV (genotype 1, MAb 1A1 Type A). Following on from this discovery and due to the disease occurrence in Mexico in 1994 where it caused crop failures of *P. vannamei*, selected lines of TSV-resistant *P. stylirostris* became the dominant shrimp farmed in western Mexico from 1995. However, in 1998–1999, a new ‘strain’ of TSV (Type B; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarain-Herzberg & Ascencio, 2001) emerged and caused massive epizootics in *P. stylirostris*. The emergence of this new ‘strain’ of TSV was soon followed in late 1999 by the introduction of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp farms in western Mexico, to which *P. stylirostris* had no resistance, effectively ending any interest in the culture of *P. stylirostris* in Mexico.

TSV-resistant domesticated stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* have been developed. Some domesticated lines of TSV-resistant *P. vannamei* (that are also TSV-free) are in widespread use by the shrimp-farming industries of the Americas and South-East Asia (Clifford, 1998; White *et al.*, 2002). After the appearance of infection with TSV in Central America, improved TSV resistance was reported in wild caught *P. vannamei* PLs used to stock shrimp farms in the region. Currently all genetic lines of *P. vannamei* shrimp that are being cultured in Asia and the Americas contain varying levels of tolerance/resistance to TSV.

### 2.4.5. Inactivation methods

No information available.

### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

It is possible that TSV might be transmitted vertically (transovarian transmission), despite the lack of published reports documenting this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is good management practice and it is recommended for its potential to reduce TSV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

### 2.4.7. General husbandry

Some husbandry and disease control and management practices have been used successfully to reduce the risks of infection with TSV occurring during farm grow-out. These include the application of PCR assays for pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001), fallowing and restocking of entire culture regions with TSV-free stocks (Dixon & Dorado, 1997), and the development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Wyban 1992). The adoption of the latter technology (SPF stocks) has proven to be among the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with TSV.

## 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

### 3.1. Selection of populations and individual specimens

---

Suitable specimens for testing for infection with TSV include PL, juveniles and adults. While TSV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be suitable samples for TSV detection ~~or certification of freedom from infection with TSV.~~

### 3.2. Selection of organs or tissues

TSV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissue in the acute phase of infection with TSV is the cuticular epithelium. In chronic infections the lymphoid organ (LO) is the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

TSV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection with TSV.

### 3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or pleopods can be collected without killing the animals and used as non-lethal sampling of genetically valuable broodstock.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

### 3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0. *General information (diseases of crustaceans)*.

#### 3.5.1. Samples for ~~pathogen isolation bioassay~~ bioassay

The success of ~~pathogen isolation bioassay~~ depends strongly on the quality of samples (which is influenced by time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

#### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

~~Tissue samples for PCR testing should be preserved in 90% (v/v) analytical/reagent grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be preserved in ethanol it may be frozen.~~

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information (diseases of crustaceans)*.

#### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Chapter 2.2.0. *General information (diseases of crustaceans)*.

#### 3.5.4. Samples for other tests

Haemolymph could be used for PCR-based detection of TSV.

### 3.6. Pooling of samples

---

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. If the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, larger animals should be processed and tested individually.

#### 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability, cost, timeliness, sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
++ =	Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
+ =	Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts						+	+	NA				
Histopathology		+	+	NA	+	+	+	NA				
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	+	+	1
Bioassay					+	+	+	1				
LAMP												
IFAT												
ELISA												
Other antigen detection methods												
Other method												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; IFAT = indirect fluorescent antibody test; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6).

<sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

#### 4.1. Wet mounts

Direct microscopy of simple unstained wet mounts from excised pieces of the gills, appendage tips, etc., examined by phase- or reduced-light microscopy may be used to demonstrate (and make a tentative diagnosis of acute-phase infection with TSV) focal lesions of acute-phase infection with TSV in cuticular epithelial cells. Preparations presenting acute-phase infection with TSV will contain numerous spherical structures (see the histopathological methods in Section 4.2.3 above), which are pyknotic and karyorrhectic nuclei and cytoplasmic remnants of necrotic cells.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

Histopathology is a useful method to detect infection with TSV in the acute and chronic phases of infection (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). In chronic infections with TSV, the only lesion typically presented by infected shrimp is the presence of an enlarged LO with multiple LO spheroids (LOS) (Hasson *et al.*, 1999b), which cannot be distinguished from LOS induced by chronic infections of other RNA viruses (Lightner, 1996a). When histological lesions are observed and infection with TSV is suspected, a molecular test (ISH with TSV-specific probes, or reverse-transcription [RT] PCR) must be used for confirmation of infection with TSV (see Section 6).

##### 4.2.1. Acute phase of Taura syndrome

The acute phase of the disease is characterised by multifocal areas of necrosis in the cuticular epithelium of the general body surface, appendages, gills, hindgut, and foregut (the oesophagus, anterior and posterior chambers of the stomach). Cells of the subcuticular connective tissues and adjacent striated muscle fibres basal to affected cuticular epithelium are occasionally affected. In some severe cases of acute-phase infection with TSV, the antennal gland tubule epithelium is also destroyed. Prominent in the multifocal cuticular lesions are conspicuous foci of affected cells that display an increased eosinophilia of the cytoplasm and pyknotic or karyorrhectic nuclei. Cytoplasmic remnants of necrotic cells are often extremely abundant in these infections with TSV acute-phase lesions and these are generally presented as spherical bodies (1–20 µm in diameter) that range in staining from eosinophilic to pale basophilic. These structures, along with pyknotic and karyorrhectic nuclei, give acute-phase TS lesions a characteristic ‘peppered’ or ‘buckshot-riddled’ appearance, which is considered to be pathognomonic for the infection when there is no concurrent necrosis of the parenchymal cells of the LO tubules. The absence of necrosis of the LO in acute-phase infection with TSV distinguishes it from acute-phase infection with yellowhead virus genotype 1 in which similar patterns of necrosis to those induced by infection with TSV may occur in the cuticular epithelium and gills (Lightner, 1996a).

In TSV-infected tissues, pyknotic or karyorrhectic nuclei give a positive (for DNA) Feulgen reaction, which distinguishes them from the less basophilic to eosinophilic cytoplasmic inclusions that do not contain DNA. The absence of haemocytic infiltration or other signs of a significant host-inflammatory response distinguishes the acute phase of infection with TSV from the transitional phase of the disease (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995; 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1995).

##### 4.2.2. Transition (recovery) phase of infection with Taura syndrome virus

In the transitional phase of infection with TSV, typical acute-phase cuticular lesions decline in abundance and severity and are replaced by conspicuous infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. The masses of haemocytes may become melanised giving rise to the irregular black spots that characterise the transition phase of the disease. In H&E sections, such lesions may show erosion of the cuticle, surface colonisation and invasion of the affected cuticle and exposed surface haemocytes by *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Sections of the LO during the transition phase of infection with TSV may appear normal with H&E staining. However, when sections of the LO are assayed for TSV by ISH with a specific cDNA probe (or by ISH with MAb 1A1 for TSV type A, genotype 1), large quantities of TSV are shown accumulating in the more peripheral parenchymal cells of the LO tubules (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

##### 4.2.3. Chronic phase of infection with Taura syndrome virus

Shrimp in the chronic phase of infection with TSV display no gross signs of infection, and histologically the only sign of infection is the presence of numerous prominent LOS, which may remain associated with the main body of the paired LO, or which may detach and become ectopic LOS bodies that lodge in constricted areas of the haemocoel (i.e. the heart, gills, in the subcuticular connective tissues, etc.). Such LOS are spherical accumulations of LO cells and haemocytes and may be distinguished from normal LO tissues by their spherical nature and the lack of the central vessel that is typical of

normal LO tubules. When assayed by ISH with a cDNA probe for TSV (or with MAb 1A1 using ISH) some cells in the LOS give positive reactions to the virus, while no other target tissues react (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b).

#### 4.3. Cell culture for virus isolation

TSV has not been grown *in vitro*, as no crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Pantoja *et al.*, 2004). Although one publication incorrectly reported that TSV infected human and monkey cell lines (Audelo del Valle *et al.*, 2003), two other laboratories that repeated the study both found that TSV does not infect or replicate in primate or human cell lines that are known to have susceptibility to human picornaviruses (Luo *et al.*, 2004; Pantoja *et al.*, 2004).

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots.

##### *Extraction of nucleic acids*

~~Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.~~

##### 4.4.1. Real-time reverse-transcription (RT)-PCR

Real-time RT-PCR methods have been developed for the detection of TSV. These methods have the advantage of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real time RT-PCR is approximately equal to 100 copies of the target sequence from the TSV genome (Dhar *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).

The real-time RT-PCR method described below for TSV follows the method used in Tang *et al.*, 2004.

##### *Primer and probe sequences, real time RT-PCR*

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Tang <i>et al.</i> , 2004); GenBank Accession No.: AF4277675			
TSV/ORF-1 Nt 1024 to 1051	Fwd: TSV1004: TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T- Rev: TSV1075 GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT	300 nM of each primer	Reverse transcription at 50°C/30 min 40 cycles of 95°C/3 sec and 60°C/30 sec
	Probe: TSV-P1 FAM-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-TAMRA,	100 nM of probe	

##### 4.4.2. Conventional RT-PCR

Tissue samples (haemolymph, pleopods, whole small shrimp etc) may be assayed for TSV using RT-PCR. The RT-PCR method outlined below for TSV follows the method used in Nunan *et al.* (1998).

##### *Primer and probe sequences, conventional RT-PCR*

Pathogen / target gene	Primer / probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Nunan <i>et al.</i> , 1998); <del>product-amplicon</del> size: 231 bp			
TSV/ORF 2	Fwd: 9992: AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT	Primers/620 nM each	Reverse transcription 60°C/30 min

	Rev:9195R: TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC		40 cycles: 94°C/45 sec, 60°C/45 sec
--	---------------------------------------	--	--

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None currently available.

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation (ISH)

##### 4.6.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for detection of TSV may be produced in the laboratory. The ISH method provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for TSV detection and diagnosis that employ classic histological methods (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner & Redman 1998; Mari *et al.*, 1998). The ISH assay of routine histological sections of acute- and transition-phase lesions in the cuticular epithelium, other tissues, and of LOS in transition and chronic phase with a specific DIG-labelled cDNA probe to TSV, provides a definitive diagnosis of infection with TSV (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Pathognomonic TSV-positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. Not reacting to the probe are the prominent karyorrhectic nuclear fragments and pyknotic nuclei that contribute to the pathognomonic 'buckshot riddled' appearance of TS lesions (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (See Chapter 2.2.4 *Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

False-negative ISH results may occur with Davidson's fixed tissues if tissues are left in fixative for more than 24–48 hours. The low pH of Davidson's fixative causes acid hydrolysis of the TSV single-stranded RNA genome, resulting in false-negative probe results. This hydrolysis can be prevented by avoiding fixation times over 24 hours (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998).

#### 4.7. Immunohistochemistry

Not suitable.

#### 4.8. Bioassay

Confirmation of infection with TSV may be accomplished by bioassay of TSV-suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the virus (Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997; Overstreet *et al.*, 1997). Oral or injection protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped carcasses of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks (White *et al.*, 2002). The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only SPF (TSV-free) tissue and normal shrimp feed is required. When the carcass feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for TSV, TSV-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of disease and unusual mortalities (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

With the injection bioassay protocol, a variety of sample types may be tested for TSV. Whole shrimp are used if they were collected during an outbreak of infection with TSV. Heads only should be used if shrimp display gross transition-phase lesions (multifocal melanised spots on the cuticle) or no clinical signs of infection (chronic phase) as the virus, if present, will be concentrated in the LO (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). For non-lethal testing of broodstock, haemolymph samples may be taken and used to expose the indicator shrimp by IM injection (Lightner, 1996a).

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

---

Not recommended.

#### 4.10. Other methods

##### 4.10.1. Dot-blot immunoassay method

- i) For the dot-blot immunoassay method, 1 µl of test antigen (purified virus, infected shrimp haemolymph or SPF shrimp haemolymph) is dotted on to the surface of MA-HA-N45 assay plates (Millipore)<sup>1</sup>.
- ii) After air drying, the wells are blocked for 1 hour at room temperature with 200 µl of a buffer containing phosphate-buffered saline and 0.05% Tween 20 (PBST) mixed with 10% normal goat serum (Life Technologies) and 2% Hammersten casein (Amersham Life Sciences).
- iii) The wells are washed three times with PBST and then reacted with 100 µl primary antibody (MAb or mouse polyclonal antibodies) for 30 minutes at room temperature.
- iv) Alkaline-phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG, γ chain specific, secondary antibody (Zymed) diluted 1/1000 in PBST plus 10% normal goat serum is used for detection (30 minutes at room temperature).
- v) After washing three times with PBST, once with PBS and once with distilled water, the reactions are visualised by development for 15 minutes at room temperature with nitroblue tetrazolium and bromo-chloro-indoyl phosphate (Roche Diagnostics in 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl buffer containing 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5).
- vi) Reactions are stopped with distilled water.
- vii) The reactions are graded using a scale from 0 to +4, with the highest intensity reaction being equivalent to the reaction generated using the MAb against the reference control consisting of semi-purified TSV. A negative reaction is one in which no coloured spot is visible in the well.

#### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate disease freedom in apparently healthy populations

Real-time RT-PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with TSV in apparently healthy populations as described in Section 4.1.1.

#### 6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (6.1) or presence of clinical signs (6.2) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. ~~It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory-Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.~~

##### 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status <sup>2</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. In addition, apparently ~~Alternatively,~~ healthy populations are sampled, ~~when~~ in surveys are carried out to demonstrate disease freedom.

##### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

---

<sup>1</sup> Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by WOA. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

<sup>2</sup> For example transboundary commodities.

---

The presence of infection with TSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- ~~i) Histopathological changes consistent with the presence of the pathogen or the disease~~
- i) A positive result by real-time RT-PCR
- ii) A positive result by conventional RT-PCR

#### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with TSV is considered to be confirmed if ~~at least one of the following~~ criteria ~~criteria~~ is met:

- i) A positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by sequencing of the amplicon
- ~~ii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR~~
- ~~iii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing~~

### 6.2. Clinically affected animals

No clinical signs are pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

#### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with TSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Histopathological changes consistent with TSV infection
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Positive result by conventional RT-PCR
- v) Positive result of a bioassay

#### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with TSV is considered to be confirmed if at least at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by sequencing of the amplicon
- ii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR
- iii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with TSV are provided in Tables 6.3.1 and 6.3.2. ~~(none-no data are currently available for either)~~. This information can be used for the design of surveys for infection with TSV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

#### 6.3.1. For surveillance of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity.

### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity.

## 7. References

- AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F. & BRISEÑO-GARCÍA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.
- BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.
- BROCK J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: *Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 84–94.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: *Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress*, D.E. Jory, ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., COWLEY J.A., HASSON K.W. & WALKER P.J. (2004). Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp. *Adv. Virus Res.*, **64**, 353–421.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*, May/June, 30–42.
- FEĞAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.
- GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 156–159.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

- 
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MARI J. & BONAMI J.R., POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.M. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.
- INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 365–379.
- JIMENEZ R. (1992). Síndrome de Taura (Resumen). *In: Acuicultura del Ecuador*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 1–16.
- JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (1996b). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.
- LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquac.*, **9**, 27–52.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 384–424.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.
- LOTZ J.M. (1997). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.
- LOTZ J.M., ANTON, L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.
- LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2260–2261.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.
- NAVARRO S.A., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.
-

- 
- NIELSEN L., SANG-OUOM W., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 101–106.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.
- NUNAN L.M., TANG-NELSON K. & LIGHTNER D.V. (2004). Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura syndrome virus. *Aquaculture*, **229**, 1–10.
- OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCLWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.
- PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.
- POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.
- ROBLES-SIKISAKA R., HASSON K.W., GARCIA D.K., BROVONT K., CLEVELAND K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2002). Genetic variation and immunohistochemical differences among geographical isolates of Taura syndrome virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **83**, 3123–3130.
- ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.
- SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 1–8.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Res.*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.
- TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- VERGEL J.C.V., CABAWATAN L.D.P., MADRONA V.A.C., ROSARIO A.F.T., STA. ANA J.B.M., TARE M.V.R. & MANINGAS M.B.B. (2019). Detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Philippines. *Philipp. J. Fish.*, **26**, 8–14.
- WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390**, 324–329.
- WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, **33**, 341–348.
- WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.
- YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **5**, 21–24.

---

ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENCIO F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

\*  
\* \*

**NB:** There is a WOAHO Reference Laboratory for infection with Taura syndrome virus  
(please consult the WOAHO Web site for the most up-to-date list:  
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).  
Please contact WOAHO Reference Laboratories for any further information on  
infection with Taura syndrome virus

**NB:** FIRST ADOPTED IN 2006. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.8.

INFECTION WITH WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

---

1. Scope

Infection with white spot syndrome virus means infection with the pathogenic agent white spot syndrome virus (WSSV), Genus *Whispovirus*, Family *Nimaviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

WSSV was assigned by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) as the only member of the genus *Whispovirus* within the *Nimaviridae* family. Virions of WSSV are ovoid or ellipsoid to bacilliform in shape, have a regular symmetry, and measure 80–120 nm in diameter and 250–380 nm in length. A flagella-like extension (appendage) may be observed at one end of the virion. WSSV has been divided into three groups: isolates originating from Thailand (WSSV-TH-96-II), isolates originating from India (WSSV-IN-07-I), and another Indian isolate (WSSV-IN-06-I). Most strains of WSSV were speculated to have originated from the Indian Ocean and then spread across the world (Zeng, 2021). Today, although various geographical isolates with genotypic variability have been identified, they are all classified as a single species (WSSV) within the genus *Whispovirus* (Lo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Viable WSSV was found in frozen commodity shrimp imported to Australia from Southeast Asia (McColl *et al.*, 2004). The virulence of WSSV was retained for 14 months at –80°C in a filtered tissue homogenate prepared from moribund shrimp with hepatopancreas and abdomen removed (Momoyama *et al.*, 1998). The virus originally collected from the haemolymph of moribund shrimp could maintain its virulence for at least 16 months at –80°C (Wu *et al.*, 2002). However, WSSV might be inactivated by multiple freeze-thaw cycles due to damage the viral envelopes or nucleocapsids (Durand *et al.*, 2000; Hasson *et al.*, 2006).

2.1.3. Survival and stability outside the host

The agent is viable for at least 30 days at 30°C in seawater under laboratory conditions (Momoyama *et al.*, 1998); and is viable in ponds for at least 3–4 days (Nakano *et al.*, 1998). Laboratory emulations of drainable and non-drainable ponds suggest that the virus is no longer infective after 21 days of sun-drying or after 40 days in waterlogged pond sediment (Satheesh Kumar *et al.*, 2013).

WSSV with an initial viral load of 1000 virions ml<sup>-1</sup> was found to be viable for a period of 12 days in seawater of 27 ppt salinity, pH of 7.5 at 29–33°C. In shrimp pond sediment (with initial viral load of 211,500 copies g<sup>-1</sup>), the virus was viable and infective up to 19 days despite sun-drying. In the case of non-drainable conditions, WSSV (753,600 copies g<sup>-1</sup>) remained infective for a period of 35 days (Satheesh Kumar *et al.*, 2013).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

---

Of all the species that have been tested to date, no decapod (order Decapoda) crustacean from marine, brackish or freshwater sources has been reported to be refractory to infection with WSSV (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo & Kou, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Stentiford *et al.*, 2009).

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with WSSV in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

#### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

All life stages are potentially susceptible, from eggs to broodstock (Lightner, 1996; Venegas *et al.*, 1999). WSSV genetic material has been detected in reproductive organs (Lo *et al.*, 1997), but susceptibility of the gametes to WSSV infection has not been determined definitively.

#### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

The best life stages of crustaceans for detection of WSSV are late postlarvae (PL) stages, juveniles and adults. Probability of detection can be increased by exposure to stressful conditions (e.g. eye-stalk ablation, spawning, moulting, changes in salinity, temperature or pH, and during plankton blooms).

#### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The major target tissues of WSSV are of ectodermal and mesodermal embryonic origin, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues (Momoyama *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Although WSSV infects the underlying connective tissue in the crustacean hepatopancreas and midgut, the tubular epithelial cells of these two organs are of endodermal origin, and they do not become infected.

#### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Wild decapods known to be reservoirs of infection with WSSV include *Mysis* sp. (Huang *et al.*, 1995), *Acetes* sp., *Alpheus* sp., *Callinassa* sp., *Exopalaemon* sp., *Helice* sp., *Hemigrapsus* sp., *Macrophthalmus* sp., *Macrophthel* sp., *Metaplex* sp., *Orithyia* sp., *Palaemonoidea* sp., *Scylla* sp., *Sesarma* sp., and *Stomatopoda* sp. (Desrina *et al.*, 2022; He & Zhou, 1996; Lei *et al.*, 2002). These species can express the disease under suitable environmental conditions. However, non-decapodal crustaceans, such as copepods (Huang *et al.*, 1995), rotifers (Yan *et al.*, 2004), *Balanus* sp. (Lei *et al.*, 2002), *Artemia* (Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010) and *Tachypleidue* sp. (He & Zhou, 1996) may be apparently healthy carrier animals. Other marine molluscs, polychaete worms (Vijayan *et al.*, 2005), as well as non-crustacean aquatic arthropods such as sea slaters (*Isopoda*), and Euphydradae insect larvae can mechanically carry the virus without evidence of infection (Lo & Kou, 1998).

#### 2.2.6. Vectors

The harpacticoid copepod *Nitocra* sp. (Zhang *et al.*, 2008), microalgae (Liu *et al.*, 2007), and the polychaete, *Dendronereis* spp. (Peters) (Desrina *et al.*, 2013; Haryadi *et al.*, 2015) are vectors for WSSV.

### 2.3. Disease pattern

Infection with WSSV sometimes causes clinical disease (Tsai *et al.*, 1999), depending on factors that are poorly understood but related to species tolerance and environmental triggers. With an appropriate infection dose to allow sufficient time before mortality, animals susceptible to disease show large numbers of virions circulating in the haemolymph (Lo *et al.*, 1997), but this may also occur for tolerant species that show no mortality. Thus, high viral loads *per se* do not cause disease or mortality for all susceptible species.

#### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

All penaeid shrimp species are highly susceptible to infection with WSSV, often resulting in high mortality. Crabs, crayfish, freshwater prawns, spiny lobsters and clawed lobsters are susceptible to infection with WSSV, but morbidity and mortality as a consequence of infection are highly variable (Lo & Kou, 1998). High level infections with WSSV are known in some decapods in the absence of clinical disease.

Prevalence of infection with WSSV is highly variable, from <1% in infected wild populations to up to 100% in captive populations (Lo & Kou, 1998).

---

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

White spots embedded within the exoskeleton are the most commonly observed clinical sign. In most shrimp, these spots range from barely visible to 3 mm in diameter, and they sometimes coalesce into larger plates. However, it should be noted that environmental stress factors, such as high alkalinity, or bacterial disease can also cause white spots on the carapace of shrimp, and that moribund shrimp with infection with WSSV may have few, if any, white spots. Therefore, the appearance of white spots is not a reliable diagnostic sign of infection with WSSV infection. High degrees of colour variation with a predominance of reddish or pinkish discoloured shrimp are seen in diseased populations.

WSSV infections can be subclinical or manifest as clinical disease. The penaeid shrimp in aquaculture will generally show clinical signs associated with high morbidity and mortality. Some animals may die without showing any clinical signs. Non-penaeid species (e.g. crab, lobster) generally have subclinical infections under natural conditions.

The affected animals can show lethargy, decreased or absent feed consumption and abnormal swimming behaviour – slow swimming, swimming on side, swimming near water surface and gathering around edges of rearing units (Corbel *et al.*, 2001; Sahul Hameed *et al.*, 1998; 2001). A very high mortality rate in the shrimp population can be expected within a few days of the onset of behavioural signs.

### 2.3.3 Gross pathology

In addition to the clinical and behavioural signs in Section 2.3.2. above, the following gross pathology has been reported in clinically affected penaeid shrimp: loosened attachment of the carapace with underlying cuticular epithelium (Sanchez-Paz, 2010), so that the carapace can be easily removed (Zhan *et al.*, 1998); empty gastro-intestinal tract due to anorexia (Escobedo-Bonilla, 2008); delayed clotting of haemolymph (Heidarieh *et al.*, 2013); excessive fouling of gills (Wu *et al.*, 2013) and exoskeleton.

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Infection with WSSV can be transmitted horizontally by consumption of infected tissue (e.g. cannibalism, predation, fomites, etc.), by water-borne routes, and by other routes of transmission (e.g. via sea birds, anthropogenic movements, feeding, rotifer, copepods, etc) (Haryadi *et al.*, 2015; Vanpatten *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; 2008). Transmission of WSSV can occur from apparently healthy animals in the absence of disease. Dead and moribund animals can be a source of disease transmission (Lo & Kou, 1998). Microalgae could serve as a potential horizontal transmission pathway for WSSV (Liu *et al.*, 2007).

True vertical transmission (intra-ovum) of WSSV to the progeny has not been demonstrated.

*In-vitro* studies with primary cell cultures and *in-vivo* studies with postlarvae show that the replication cycle is approximately 20 hours at 25°C (Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

### 2.3.5. Environmental factors

Disease outbreaks may be induced by stressors, such as rapid changes in salinity. Water temperature has a profound effect on disease expression, with average water temperatures of between 18 and 30°C being conducive to WSSV outbreaks (Song *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001). Under experimental challenge condition, WSSV-induced mortality in shrimp is reduced when the temperature increases above 32°C (Vidal *et al.*, 2001).

### 2.3.6. Geographical distribution

Infection with WSSV has been identified from crustaceans in Asia, the Mediterranean (Stentiford & Lightner, 2011), the Middle East, Oceania (Moody *et al.*, 2022) and the Americas. Zones and compartments free from infection with WSSV are known within these regions (Lo *et al.*, 2012).

See WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

No consistently effective vaccination methods have been developed for infection with WSSV.

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No published or validated methods.

#### 2.4.3. Immunostimulation

Several reports have shown that beta-glucan, vitamin C, seaweed extracts (fucoidan) and other immunostimulants may improve resistance to infection with WSSV (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004).

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

Progress in breeding *P. vannamei* for resistance to infections with WSSV has been reported (Cuellar-Anjel *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012).

#### 2.4.5. Inactivation methods

Method	Treatment	Reference
Heat	55°C/90 min 70°C/5 min	Chang <i>et al.</i> , 1998
	50°C/60 min 60°C/1 min 70°C/0.2 min	Nakano <i>et al.</i> , 1998
pH	pH 3/60 min pH 12/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
UV	$9.30 \times 10^5 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Ozone	$0.5 \mu\text{g ml}^{-1}/10 \text{ min}$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Chlorine	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
Iodophore	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

For transovum transmission, disinfection of egg is likely to be effective (Lo & Kou, 1998), but this has not yet been confirmed in formal scientific trials.

#### 2.4.7. General husbandry

Management practices in endemic areas principally involve the exclusion of WSSV from production populations or avoiding risk factors for development of clinical disease. Examples include avoiding stocking in the cold season, use of specific pathogen-free (SPF) or polymerase chain reaction (PCR)-negative seed stocks, use of biosecure water and culture systems (Withyachumnarnkul, 1999). Polyculture of shrimp and fish has been proposed to reduce WSSV transmission in infected populations (Wang *et al.*, 2021).

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs or exhibit behavioural changes (Sections 2.3) should be selected for detection of WSSV.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

---

Tissue tropism analysis from both experimentally infected shrimp and wild-captured brooders shows that tissues originating from the ectoderm and mesoderm, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues, as well as other target tissues (e.g. antennal gland, haematopoietic organ, etc.), are the main target tissues for infection with WSSV. Samples from the pleopods, gills, haemolymph, stomach or abdominal muscle are recommended for submission (Lo *et al.*, 1997).

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Although WSSV infects the underlying connective tissue in the shrimp hepatopancreas and midgut, the columnar epithelial cells of these two organs are of endodermal embryonic origin (Lo *et al.*, 1997) and are not appropriate tissues for detection. The compound eye may contain a PCR inhibitor (Lo *et al.*, 1997) and is therefore not suitable for PCR-based diagnosis.

### 3.4. Non-lethal sampling

Gill, haemolymph or pleopod are suitable tissues for non-lethal sampling and screening by PCR.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

### 3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

#### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

~~The success of pathogen isolation and~~ results of bioassay depend strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

#### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen.

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

#### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

#### 3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

### 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore larger specimens should be processed and tested individually. Small life stages can be pooled to obtain the minimum amount of material for virus isolation or molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

---

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology					+	+	+	1				
Cell culture												
Real-time PCR	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	2
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	+	+	1
Bioassay					+	+	+	1				
LAMP	++	++	++	1	++	++	++	1	+	+	+	1
Ab-ELISA					+	+	+	1				
Ag-ELISA					+	+	+	1				
Other antigen detection methods					+	+	+	1				
Other methods												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

#### 4.1. Wet mounts

Demonstration of hypertrophied nuclei in squash preparations of the gills and/or cuticular epithelium, which may be stained or unstained.

##### *T-E staining*

A T-E staining solution may be prepared from Trypan blue 0.6%, Eosin Y 0.2%, NaCl 0.5%, phenol 0.5%, and glycerol 20% (Huang & Yu, 1995) and used as follows:

- i) Place a piece of diseased tissue (e.g. a piece of gill or stomach epithelium without the cuticle) on a slide and mince with a scalpel.
- ii) Add 1–2 drops of the T-E staining solution to the minced tissue, mix and allow to stain for 3–5 minutes.
- iii) Lay a cover glass over the stained tissue and cover with several pieces of absorbent paper. Use a thumb to squash the mince into a single layer of cells.

If the sample was taken from a heavily infected shrimp, hypertrophied nuclei and intranuclear eosinophilic or vacuolation-like inclusion bodies can be observed using light microscopy (400–1000× magnification).

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

##### *Smears*

Demonstration of aggregates of WSSV virions in unstained smear preparations of haemolymph by dark-field microscopy.

NOTE: This is the simplest of the microscopic techniques and is recommended for people with limited expertise in diagnosing infection with WSSV. The aggregates appear as small reflective spots of 0.5 µm in diameter (Momoyama *et al.*, 1995).

##### *Fixed sections*

Histological changes commonly reported in susceptible species include: Hypertrophied nuclei with marginated chromatin material in virus-infected cells; eosinophilic to pale basophilic (with haematoxylin & eosin stain) stained intranuclear viral inclusions within hypertrophied nuclei and multifocal necrosis associated with pyknotic and karyorrhectic nuclei in affected tissues of ectodermal and mesodermal origin. The infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, another DNA virus, produces similar inclusions that need to be differentiated from those of WSSV.

#### 4.3. Cell culture for isolation

WSSV can be isolated from primary cultures of lymphoid or ovary cells. However, it is NOT recommended to use cell culture as a routine isolation method because of: 1) the high risk of contamination, and, 2) the composition of the medium varies depending on the tissue type, host species and experimental purpose; that is, to date there is no standard or recognised medium that can be recommended. As primary cell culture is so difficult to initiate and maintain for virus isolation purposes, bioassay should be the primary means for virus propagation.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

##### *Extraction of nucleic acids*

~~Numerous~~ Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and ~~should~~ can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

##### 4.4.1. Real-time PCR

The real-time PCR methods described by Durand & Lightner (2002) and Sritunyalucksana *et al.* (2006) are described here as modified and validated by Moody *et al.*, (2022).

Pathogen/Target	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Durand & Lightner, 2002 <sup>1</sup> ; GenBank Accession No.: <a href="#">NC_003225</a>			
WSSV/ <del>ORF-X</del> Capsid protein	Fwd WSS1011F: TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG Rev WSS1079R: GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A Probe: <u>6FAM-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-TAMRA</u>	900 nM 900 nM 250 nM	45 cycles of: <u>95°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u> <u>50°C/2 min,</u> <u>95°C/10 min,</u> <u>then 45 cycles of:</u> <u>94°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u>
Method 2: Sritunyalucksana, 2006 <sup>1</sup> ; GenBank Accession No.: <a href="#">AF440570</a>			
WSSV/ <del>ORF-X</del> Capsid protein	Fwd CSIRO WSSV-F: CCG-ACG-CCA-AGG-GAA-CT Rev CSIRO WSSV-R: TTC-AGA-TTC-GTT-ACC-GTT-TCC-A Probe: <u>6FAM-CGC-TTC-AGC-CAT-GCC-AGC-CG-TAMRA</u>	900 nM 900 nM 250 nM	45 cycles of: <u>95°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u> <u>50°C/2 min,</u> <u>95°C/10 min,</u> <u>then 45 cycles of:</u> <u>94°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u>

<sup>1</sup>Method described here as modified and validated by Moody *et al.*, 2022

#### 4.4.2. Conventional PCR

Pathogen/Target	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Lo <i>et al.</i> , 1996a; GenBank Accession No.: <a href="#">AF440570</a> ; amplicon size: 1447/941 bp			
WSSV (nested PCR)	<u>Outer-Primary</u> Fwd <u>146F1</u> : ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG Rev 146R1: TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A  <u>Inner-Nested</u> Fwd 146F2: GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A Rev 146R2: TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG	100 pmol 100 pmol  100 pmol 100 pmol	39 cycles of 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min  39 cycles of 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min

Commercial PCR kits are available. Please consult the WOAHP Register for kits that have been certified by WOAHP (<https://www.woah.org/en/what-we-offer/veterinary-products/#ui-id-5>).

#### 4.4.3. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method

The protocol described here is from Kono *et al.* (2004). The LAMP method is sensitive and rapid, and it amplifies the target nucleic acids under isothermal conditions, therefore needing no sophisticated machine for thermal cycling.

##### DNA extraction

DNA extraction could be performed according to the protocol described in Section 4.4.2 *Conventional PCR* or by other suitable methods or by commercial kits.

##### LAMP reaction

- 
- i) Add DNA to a tube to set up a 25 µl reaction mixture (20 mM Tris/HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20, 0.8M Betaine, 1.4 mM of each dNTP, 40 pmol of WSSV-FIP and -BIP primers, 5 pmol of WSSV-F3 and -B3 primers).
  - ii) The primer sequences are WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC- GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA-CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
  - iii) Heat the mixture at 50°C for 5 minutes and at 95°C for 5 minutes, then chill on ice, and add 1 µl (8 U) of *Bst* DNA polymerase.
  - iv) Incubate the mixture at 65°C for 60 minutes, and then terminate the reaction at 80°C for 10 minutes.
  - v) To visualise, electrophorese 2 µl LAMP reaction products on 2% agarose gels containing ethidium bromide at a concentration of 0.5 µg ml<sup>-1</sup>. This reaction produces WSSV-specific LAMP products with multiple bands of various sizes from approximately 200 bp to the loading well.

Reliable LAMP commercial kits may be an alternative for WSSV diagnosis.

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

Use of WSSV-specific DNA probes with histological sections is useful to demonstrate the presence of WSSV nucleic acid in infected cells (Nunan & Lightner, 1997). See Chapter 2.2.0 Section 5.5.4 for general comments on *in-situ* hybridisation.

#### 4.7. Immunohistochemistry

See Section 4.9.

#### 4.8. Bioassay

If SPF shrimp are available, the bioassay method based on Nunan *et al.* (1998) and Durand *et al.* (2000), is suitable for WSSV diagnosis.

#### 4.9. Antigen detection methods

Both polyclonal and monoclonal antibodies raised against either the virus or a recombinant viral structural protein have been used in various immunological assays including western blot analysis, immunodot assay, indirect fluorescent antibody test (IFAT), immunohistochemistry (IHC) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect WSSV (Huang *et al.*, 1995; Poulos *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2006; Yoganandhan *et al.*, 2004).

#### 4.10. Other methods

Lateral flow tests are commercially available but their performance needs to be evaluated before they can be recommended.

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with WSSV in apparently healthy populations as described in Section 4.4.1.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

---

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. ~~It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.~~

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with WSSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by conventional PCR
- ii) Positive result by real-time PCR
- iii) Positive result by LAMP method

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with WSSV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR method followed by amplicon sequencing
- ~~iii) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by real-time PCR~~
- ~~iv) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by conventional PCR followed by amplicon sequencing~~

## 6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with WSSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs consistent with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Histopathology consistent with WSSV infection
- iii) Positive result by conventional PCR
- iv) Positive result by real-time PCR
- v) Positive result by LAMP method
- vi) Positive result by *in-situ* hybridisation

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with WSSV is considered to be confirmed if at least at least one of the following criteria is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR method followed by amplicon sequencing
- iii) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by real-time PCR
- iv) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by conventional PCR followed by amplicon sequencing

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with WSSV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with WSSV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

#### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Real-time PCR (Durand & Lightner, 2002)	Diagnosis	Clinically diseased shrimp from farms	Gill, pleopod	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	Real-time PCR	Moody <i>et al.</i> , 2022
Real-time PCR (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006)	Diagnosis	Clinically diseased shrimp from farms	Gill, pleopod	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	Real-time PCR	Moody <i>et al.</i> , 2022

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study, PCR = polymerase chain reaction.

\*The nested PCR (Lo *et al.*, 1996a) is linked to false positives for WSSV when they are used to test species of *Cherax quadricarinatus* (Claydon *et al.*, 2004).

#### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Real-time PCR (Durand & Lightner, 2002)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	76.8% (n=1591)	99.7% (n=1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022
Real-time PCR (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	82.9% (n=1591)	99.7% (n=1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022

Two real-time PCR methods in parallel (Sritunyaluksana <i>et al.</i> , 2006 and Durand & Lightner, 2002)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	98.3% ( <i>n</i> =1591)	99.4% ( <i>n</i> =1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022
--	--	---------------------------------	---------------	--	----------------------------	----------------------------	--------------------------------	----------------------------

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study, PCR: = polymerase chain reaction.

## 7. References

- BALASUBRAMANIAN G., SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *J. Fish Dis.*, **29**, 569–572.
- CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.
- CHANG P.S., CHEN H.C. & WANG Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233–242.
- CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.
- CHANG Y., CHEN T., LIU W., HWANG J. & LO C. (2011). Assessment of the roles of copepod *Apocyclops royi* and bivalve mollusk *Meretrix lusoria* in white spot syndrome virus transmission. *Mar. Biotechnol.*, **13**, 909–917.
- CHEN I.T., AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F., WANG H.C. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85**, 12919–12928.
- CHEN W.Y., ZHANG H., GU L., LI F. & YANG F. (2012). Effects of high salinity, high temperature and pH on capsid structure of white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.*, **101**, 167–171.
- CHOTIGEAT W., TONGSUPA S., SUPAMATAYA K. & PHONGDARA A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, **233**, 23–30.
- CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.
- CORBEL V., ZUPRIZAL Z., SHI C., HUANG, SUMARTONO, ARCIER J.-M. & BONAMI J.-R. (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377–382.
- CUELLAR-ANJEL J., WHITE-NOBLE B., SCHOFIELD P., CHAMORRO R. & LIGHTNER D.V. (2012). Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, **368–369**, 36–39.
- DESRINA, PRAYITNO S.B, VERDEGEM M.C.J, VERRETH J.A.J. & VLAK J.M. (2022). White spot syndrome virus host range and impact on transmission. *Rev. Aquacult.*, 1–18.
- DESRINA, VERRETH J.A.J., PRAYITNO S.B., ROMBOUT J.H.W.M., VLAK J.M. & VERDEGEM M.C.J. (2013). Replication of white spot syndrome virus (WSSV) in the polychaete *Dendronereis* spp. *J. Invertebr. Pathol.*, **114**, 7–10.
- DURAND S.V. & LIGHTNER D.V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.
- DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.

- 
- EAST I.J. (2008). Addressing the problems of using the polymerase chain reaction technique as a stand-alone test for detecting pathogens in aquatic animals. *Sci. Tech. Rev.*, **27**, 829–837.
- ESCOBEDO-BONILLA C. M., ALDAY-SANZ V., WILLE M., SORGELOOS P., PENSART M.B. & NAUWYNCK H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.*, **31**, 1–18.
- FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.
- HASSON K.W., FAN Y., REISINGER T., VENUTI J. & VARNER P.W. (2006). White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas fresh water systems through imported, frozen bait-shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 91–100.
- HARYADI D., VERRETH J.A.J., VERDEGEM M.C.J. & VLAK J.M. (2015). Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from *Dendronereis* spp. (Peters) (Nereididae) to penaeid shrimp. *J. Fish Dis.*, **38**, 419–428.
- HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.
- HEIDARIEH M., SOLTANI M., MOTAMEDI SEDEH F. & SHEIKHZADEH N. (2013). Low water temperature retards white spot syndrome virus replication in *Astacus leptodactylus* Crayfish. *Acta Sci. Vet.*, **41**, 1–6.
- HUANG J. & YU J. (1995). A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 31–39.
- HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z. & YANG C.-H. (1995). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 40–50.
- HUANG Y., YIN Z., WENG S., HE J. & LI S. (2012). Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, **364–365**, 111–117.
- KONO T., SAVAN R., SAKAI M., & ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **115**, 59–65.
- LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K. (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). *Oceanol. Limnol. Sin.*, **33**, 250–258.
- LI Q., ZHANG J.H., CHEN Y.J. & YANG F. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 261–264.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- LIU B., YU Z.M., SONG X.X. & GUAN Y.Q. (2007). Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *J. Invertebr. Pathol.*, **95**, 87–92.
- LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R., FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K., WALKER P.W. WANG H.C., XUN X., YANG F. & VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. USA, pp 229–234.
- LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.
- LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.
-

- 
- LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.
- LO C.F., LEU J.H., HO C.H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. & KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.
- MCCOLL K.A., SLATER J., JEYASEKARAN G., HYATT A.D. & CRANE M.St.J. (2004). Detection of White Spot Syndrome virus and Yellow head virus in prawns imported into Australia. *Australian Vet. J.*, **82**, 69–74.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K., KIMURA T. & NAKANO H. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBE H., INOUE K. & OSEKO N. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.
- MOODY N.J.G., MOHR P.G., WILLIAMS L.M., CUMMINS D.M., HOAD J., SLATER J., VALDETER S.T., COLLING A., SINGANALLUR N.B., GARDNER I.A., GUDKOV N. & CRANE M.St.J. (2022). Performance characteristics of two real-time, TaqMan polymerase chain reaction assays for the detection of WSSV in clinically diseased and apparently health prawns. *Dis. Aquat. Org.*, <https://www.int-res.com/prepress/d03687.html>.
- NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.
- SAHUL HAMEED A.S., ANILKUMAR M., STEPHEN RAJ M.L. & JAYARAMAN K. (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*, **160**, 31–45.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SATHISH S., RASHEED M., MURUGAN V. & JAYARAMAN K. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, **201**, 179–186.
- SANCHEZ-PAZ A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.*, **41**, 43.
- SATHEESH KUMAR S., ANANDA BHARATHI R., RAJAN J.J.S., ALAVANDI S.V., POORNIMA M., BALASUBRAMANIAN C.P. & PONNIAH A.G. (2013). Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. *Aquaculture*, **402–403**, 119–126.
- SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAIVISUTHANGKURA P. & SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.
- SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20**, 374–378.
-

- 
- SRITUNYALUCKSANA K., SRISALA J., MCCOLL K., NIELSEN L. & FLEGEL T.W. (2006). Comparison of PCR methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 255, 95–104.
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellowhead disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, 291, 1–17.
- STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture*, 319, 302–306.
- TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999). Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, 38, 107–114.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Sea birds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, 241, 31–46.
- VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, 34, 19–23.
- VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, 32, 364–372.
- VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEK HAR V. & SANTIAGO T.C. (2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, 63, 107–111.
- WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, 41, 91–104.
- WANG H.C., HIRONO I, MANINGAS M.B.B., SOMBOONWIWA K., STENTIFORD G. & ICTV REPORT CONSORTIUM. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: The ICTV 10<sup>th</sup> Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature*. The ICTV website ([www.ictv.global/report/nimaviridae](http://www.ictv.global/report/nimaviridae)).
- WANG M., CHEN Y., ZHAO Z., WENG S., YANG J., LIU S., LIU C., YUAN F., AI B., ZHANG H., ZHANG M., LU L., YUAN K., YU Z., MO B., LIU X., GAI C., LI Y., LU R., ZHONG Z., ZHENG L., FENG G., LI S.C. & HE J. (2021). A convenient polyculture system that controls a shrimp viral disease with a high transmission rate. *Commun Biol.*, 4, 1276.
- WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, 39, 21–27.
- WONGTEERASUPAYA C., VICKERS J.E., SRIURAIRATANA S., NASH G.L., AKARAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 21, 69–77.
- WU J.L., SUZUKI K., ARIMOTO M., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (2002). Preparation of an Inoculum of White Spot Syndrome Virus for Challenge Tests in *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, 37, 65–69.
- WU W., WU B., YE T., HUANG H., DAI C., YUAN J. & WANG W. (2013). TCTP is a critical factor in shrimp immune response to virus infection. *PLoS One*, 8, e74460.
- YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, 59, 69–73.
- YAN D.C., DONG S.L., HUANG J. & ZHANG J.S. (2007). White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J. Invertebr. Pathol.*, 94, 144–148.
- YOGANANDHAN K., SYED MUSTHAQ S., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, 27, 517–522.
- ZENG Y. (2021). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus in the world. *Aquaculture*, 537, 736509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736509>.
-

---

ZHAN W.B., WANG Y.H., FRYER J.L., YU K.K., FUKUDA H. & MENG Q.X. (1998). White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 405–410.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L., CAO Y.C. & LI Z.J., YAN D.C. (2010). Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Vet. Res. Commun.*, **34**, 25–32.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L. & HOU C.Q. (2008). Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *J. Invertebrate Pathol.*, **97**, 33–39.

ZHANG J.S., DONG S.L., TIAN X.L., DONG Y.W., LIU X.Y. & YAN D.C. (2006). Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, **261**, 1181–1185.

\*  
\* \*

**NB:** There are WOA Reference Laboratories for infection with white spot syndrome virus  
(please consult the WOA web site:  
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on  
infection with white spot syndrome virus

**NB:** FIRST ADOPTED IN 1997 AS WHITE SPOT DISEASE. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

CHAPTER 2.3.1.

INFECTION WITH APHANOMYCES INVADANS (EPIZOOTIC  
ULCERATIVE SYNDROME)

---

1. Scope

Infection with *Aphanomyces invadans* means all infections caused by the oomycete fungus *A. invadans* of the Genus *Aphanomyces* and Family *Leptolegniaceae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

**2.1.1. Aetiological agent**

Infection with *A. invadans* is most commonly known as epizootic ulcerative syndrome (EUS) (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 1986). It has also been known as red spot disease (RSD) (Mckenzie & Hall, 1976), mycotic granulomatosis (MG) (Egusa & Masuda, 1971; Hanjavanit, 1997) and ulcerative mycosis (UM) (Noga & Dykstra, 1986). The disease is caused by the oomycete *Aphanomyces invadans*.

Infection with *A. invadans* is a seasonal epizootic condition of great importance in wild and farmed freshwater and estuarine fish. It is clinically characterised by the presence of invasive, non-septate hyphae in skeletal muscle, usually leading to a granulomatous response. Infections with *A. invadans* have spread widely since the first outbreak in 1971 in Japan and to date a high degree of genetic homogeneity is observed for this species based on publicly available genome sequences (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2009; European Food Safety Authority [EFSA] 2011a; Huchzermeyer *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018; Lilley *et al.*, 2003). Other pathogenic viruses (mostly rhabdoviruses), bacteria (mainly *Aeromonas hydrophila*), fungi, oomycetes and parasites are routinely co-isolated from *A. invadans*-infected fish (Iberahim *et al.*, 2018).

*Aphanomyces invadans* is within a group of organisms commonly known as the water moulds. Although long-regarded as fungi because of their characteristic filamentous growth, this group, the Oomycota, is not considered a member of the Eumycota (true fungi) but is classified with diatoms and brown algae in a group called the Heterokonta or Stramenopiles within the Kingdom Chromista (Cavalier-Smith & Chao 2006; Tsui *et al.*, 2009). Junior synonyms of *A. invadans* include *Aphanomyces piscicida* and *Aphanomyces invaderis*.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

There is limited published data on the stability of the pathogen in host tissues. It is not clear whether the pathogen continues to grow for some time following the death of the host (Oidtmann, 2012).

*Aphanomyces invadans* cultures can be maintained for extended periods in glucose phosphate broth (6 weeks at 10°C), agar slopes and sodium phosphate buffer (over 6 months at 20°C) (Lilley *et al.*, 1998).

2.1.3. Survival and stability outside the host

How *A. invadans* survives outside the host is unclear (Oidtmann, 2012). It is assumed that the motile zoospores, which are released from an infected fish, will encyst when unsuccessful in finding a suitable substrate to grow on (Oidtmann, 2012). Encysted zoospores of *A. invadans* are capable of releasing a new zoospore generation instead of germinating in a process called repeated zoospore emergence (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2009). There is no suitable method to recover or isolate the encysted zoospore from affected fish ponds (Afzali *et al.*, 2013). How long the encysted spore can survive

in water or on a non-fish substrate is unclear. In an *in-vitro* experiment, the encysted zoospore survived for at least 19 days (Lilley *et al.*, 2001).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

## 2.2. Host factors

### 2.2.1. Susceptible host species

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with *A. invadans* in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

**Table 2.1.** Fish species susceptible to infection with *Aphanomyces invadans*

Family	Scientific name	Common name
Alestidae	<i>Brycinus lateralis</i>	striped robber
	<i>Hydrocynus vittatus</i>	tigerfish
	<i>Micralestes acutidens</i>	silver robber
Ambassidae	<i>Ambassis agassizii</i>	chanda perch
Apogonidae	<i>Glossamia aprion</i>	mouth almighty
Ariidae	<i>Arius sp.</i>	fork-tailed catfish
Belontiidae	<i>Strongylura krefftii</i>	long tom
Centrarchidae	<i>Lepomis macrochirus</i>	bluegill
	<i>Micropterus salmoides</i>	largemouth black bass
Channidae	<i>Channa marulius</i>	great snakehead fish
	<i>Channa striatus</i>	striped snakehead
Cichlidae	<i>Coptodon rendalli</i>	redbreast tilapia
	<i>Oreochromis andersoni</i>	three-spotted tilapia
	<i>Oreochromis machrochir</i>	greenhead tilapia
	<i>Sargochromis carlottae</i>	rainbow bream
	<i>Sargochromis codringtonii</i>	green bream
	<i>Sargochromis giardi</i>	pink bream
	<i>Serranochromis angusticeps</i>	thinface largemouth
	<i>Serranochromis robustus</i>	Nembwe
	<i>Tilapia sparrmanii</i>	banded tilapia
Clariidae	<i>Clarias gariepinus</i>	sharptooth African catfish
	<i>Clarias ngamensis</i>	blunt-toothed African catfish
	<i>Clarius batrachus</i>	walking catfish
Clupeidae	<i>Alosa sapidissima</i>	American shad
	<i>Brevoortia tyrannus</i>	Atlantic menhaden
	<i>Nematalosa erebi</i>	bony bream
Cyprinidae	<i>Barbus paludinosus</i>	straightfin barb
	<i>Barbus poechii</i>	dashtail barb
	<i>Barbus thamalakanensis</i>	Thamalakane barb
	<i>Barbus unitaeniatus</i>	longbeard barb
	<i>Carassius auratus</i>	goldfish
	<i>Catla catla</i>	catla
	<i>Cirrhinus mrigala</i>	mrigal
	<i>Esomus sp.</i>	flying barb
	<i>Labeo cylindricus</i>	red-eye labeo
	<i>Labeo lunatus</i>	upper Zambezi labeo
	<i>Labeo rohita</i>	rohu
	<i>Puntius gonionotus</i>	silver barb

Family	Scientific name	Common name
	<i>Puntius sophore</i>	pool barb
	<i>Rohtee sp.</i>	keti-Bangladeshi
Eleotridae	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	sleepy cod
	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	marble goby
Gobiidae	<i>Glossogobius giuris</i>	bar-eyed goby
	<i>Glossogobius sp.</i>	goby
	<i>Tridentiger obscures obscures</i>	dusky tripletooth goby
Helostomatidae	<i>Helostoma temmincki</i>	kissing gourami
Hepsetidae	<i>Hepsetus odoe</i>	African pike
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	black bullhead
	<i>Ameiurus nebulosus</i>	black bullhead
	<i>Amniataba percoides</i>	striped grunter
	<i>Ictalurus punctatus</i>	channel catfish
Kurtidae	<i>Kurtus gulliveri</i>	nursery fish
Latidae	<i>Lates calcarifer</i>	barramundi or sea bass
Lutjanidae	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	mangrove jack
Melanotaeniidae	<i>Melanotaenia splendida</i>	rainbow fish
Mormyridae	<i>Marcusenius macrolepidotus</i>	bulldog
	<i>Petrocephalus catostoma</i>	churchill
Mugilidae	<i>Mugilidae (Mugil spp.; Liza spp.)</i>	mullet
	<i>Mugil cephalus</i>	grey mullet or striped mullet
	<i>Mugil curema</i>	white mullet
	<i>Myxus petardi</i>	mullet
Osmeroidei	<i>Plecoglossus altivelis</i>	ayu
Osphronemidae	<i>Colisa lalia</i>	dwarf gourami
	<i>Osphronemus goramy</i>	giant gourami
	<i>Trichogaster pectoralis</i>	snakeskin gourami
	<i>Trichogaster trichopterus</i>	three-spot gourami
Osteoglossidae	<i>Scleropages jardini</i>	saratoga
Percichthyidae	<i>Maccullochella ikei</i>	freshwater cod
	<i>Maccullochella peelii</i>	Murray cod
	<i>Macquaria ambigua</i>	golden perch
	<i>Macquaria novemaculeata</i>	Australian bass
Platycephalidae	<i>Platycephalus fuscus</i>	dusky flathead
Psettodidae	<i>Psettodes sp.</i>	spiny turbot
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	rainbow trout
Scatophagidae	<i>Scatophagus argus</i>	spotted scat
	<i>Selenotoca multifasciata</i>	striped scat
Schilbeidae	<i>Schilbe intermedius</i>	silver catfish
	<i>Schilbe mystus</i>	African butter catfish
Sciaenidae	<i>Bairdiella chrysoura</i>	drums or croakers
	<i>Pogonias cromis</i>	black drum
Sillaginae	<i>Sillago ciliata</i>	sand whiting
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	wels catfish
Soleidae	<i>Aseraggodes macleayanus</i>	narrow banded sole
Sparidae	<i>Acanthopagrus australis</i>	yellowfin sea bream
	<i>Acanthopagrus berda</i>	black bream
	<i>Archosargus probatocephalus</i>	sheepshead
Synbranchidae	<i>Fluta alba</i>	swamp eel
Terapontidae	<i>Anabas testudineus</i>	climbing perch
	<i>Bidyanus bidyanus</i>	silver perch

Family	Scientific name	Common name
	<i>Leiopotherapon unicolor</i>	spangled perch
	<i>Scortum barcoo</i>	Barcoo Grunter
	<i>Therapon sp.</i>	therapon
Toxotidae	<i>Toxotes chatareus</i>	common archerfish
	<i>Toxotes lorentzi</i>	primitive acherfish

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility [under study]

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *A. invadans* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: [under study]

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Subadult and adult fish are usually described as the susceptible life stages to natural outbreaks of EUS (FAO, 2009). However, there are reports of infection with *A. invadans* being found in early life stages (fish fry or fish larvae) (Baldock et al., 2005; EFSA 2011a). While the size of the fish does not determine an EUS outbreak (Cruz-Lacierda & Shariff, 1995), younger fish seem to be more prone to EUS compared with adult fish (Gomo et al., 2016; Pagrut et al., 2017).

An experimental injection of *A. invadans* into the yearling life stage of Indian major carp, catla (*Catla catla*), rohu (*Labeo rohita*) and mrigal (*Cirrhinus mrigala*), revealed resistance to *A. invadans* (Pradhan et al., 2007), even though they are naturally susceptible species. Experimental infections demonstrated that goldfish (*Carassius auratus*) are susceptible (Hatai et al., 1977; 1994), but common carp (*Cyprinus carpio*) (Wada et al., 1996), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Khan et al., 1998) and European eel (*Anguilla anguilla*), (Oidtmann et al., 2008) are considered resistant.

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

During the course of an infection with *A. invadans*, the free-swimming zoospore attaches to the skin of a fish host, encysts and germinates to develop hyphae invading and ramifying through host tissues (Kiryu et al., 2003; Lilley et al., 1998). The hyphal invasion and associated pathology are not confined to the region of dermal ulcers. The hyphae readily invade the body cavity and produce mycotic granulomas in all the visceral organs (Vishwanath et al., 1998). In fish either suspected or confirmed to be infected with *A. phanomyces invadans*, hyphae have also been observed in kidney, liver, spleen, pancreatic tissue, gut, parietal peritoneum, swim bladder, gonads, spinal cord, meninges, vertebrae, inter-muscular bones, the mouth region, and the orbits (Chinabut & Roberts, 1999; Vishwanath et al., 1998; Wada et al., 1996).

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

~~There is no information to indicate that fish can be lifelong carriers of *A. invadans*.~~ Generally, most infected fish die during an outbreak. Although some fish with mild or moderate infections could recover, they are unlikely to be lifelong carriers of *A. invadans*.

### 2.2.6. Vectors

No data available.

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

The prevalence of infection with *A. invadans* in the wild and in aquaculture farms may be high (20–90%), in endemic areas with high levels of mortality observed. Mortality patterns appear to be seasonal and can vary substantially (Herbert et al., 2019).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Fish usually develop red spots or small-to-large ulcerative lesions on the body. The occurrence of skin lesions and ultimately mortality varies according to fish species. Fish presenting with lesions are usually weak, appear darker in colour, have a reduced appetite, are immobile and may float at the surface of the water. Generally infected fish are

---

encountered in shallow water and present a retarded ability to escape capture occasionally followed by short lived bouts of hyperactivity characterised by jerky movements (Huchzermeyer *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018).

### 2.3.3 Gross pathology

Early-stage lesions or mildly infected fish are characterised by red spots observed on the lateral body surface, head, operculum or caudal peduncle of the infected fish. Scales of infected fish are often protruding or lost. In severe cases, swollen haemorrhagic areas, massive inflammation and large deep ulcers exposing the underlying necrotic muscle tissue are observed (Huchzermeyer *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018). In advanced stages of the disease, the severity of the disease results in death of the fish (Hawke *et al.*, 2003; Iberahim *et al.*, 2018).

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

*Aphanomyces invadans* has an aseptate fungal-like mycelia structure. This oomycete has two typical zoospore forms. The primary zoospore consists of round cells that develop inside the sporangium. The primary zoospore is released to the tip of the sporangium where it forms a spore cluster. It quickly transforms into the secondary zoospore, which is a reniform, laterally biflagellate cell and can swim freely in the water. The secondary zoospore remains motile for a period that depends on the environmental conditions and presence of the fish host or substratum. Typically, the zoospore encysts and germinates to produce new hyphae, although further tertiary generations of zoospores may be released from cysts (repeated zoospore emergence or polyplanetism) (Lilley *et al.*, 1998). The *A. invadans* zoospores can be horizontally transmitted from one fish to another through the water supply. It is believed that only the secondary zoospores or free-swimming stage zoospores are capable of attaching to the damaged skin of fish and germinating into hyphae. If the secondary zoospores cannot find the susceptible species or encounter unfavourable conditions, they can encyst in the pond environment. The cysts may wait for conditions that favour their transformation into tertiary generations of zoospores that are also in the free-swimming stage. The encysting property of *A. invadans* may play an important role in the cycle of outbreaks in endemic areas.

### 2.3.5. Environmental factors

Under natural conditions, infection with *A. invadans* has been reported at water temperatures in the range 10–33°C (Bondad-Reantaso *et al.*, 1992; Hawke *et al.*, 2003) often associated with massive rainfall (Bondad-Reantaso *et al.*, 1992). These conditions favour sporulation of *A. invadans* (Lumanlan-Mayo *et al.*, 1997), and temperatures of 17–19°C have been shown to delay the inflammatory response of fish to oomycete infection (Catap & Munday, 1998; Chinabut *et al.*, 1995). In some countries, outbreaks occur in wild fish first and then spread to fish ponds. Normally, a bath infection of *A. invadans* in healthy susceptible fish species does not result in clinical signs of disease. The presence of other pathogens (viruses, bacteria or ectoparasites, skin damage, water temperature (between 18 and 22 °C), low pH (6.0–7.0) and low oxygen concentration in the water have all been hypothesised as predisposing factors for infection or factors influencing the expression of the disease (Oidtmann, 2012; Iberahim *et al.*, 2018).

Movements of live ornamental fish from countries from which infection with *A. invadans* is confirmed may spread the disease as was the case with the outbreak in Sri Lanka (Balasuriya, 1994). Flooding also caused the spread of infection with *A. invadans* in Bangladesh and Pakistan (Lilley *et al.*, 1998). Once an outbreak occurs in rivers/canals, the disease can spread downstream as well as upstream where the susceptible fish species exist.

*Aphanomyces invadans* grows best at 20–30°C; it does not grow *in-vitro* at 37°C. Water salinity over 2 parts per thousand (ppt) can stop spread of the agent. Under laboratory conditions the optimal growth temperature range for *A. invadans* is 19–22°C, while under natural conditions *A. invadans* seems to be more robust (Hawke *et al.*, 2003).

### 2.3.6. Geographical distribution

Infection with *A. invadans* was first reported in farmed freshwater ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Asia in 1971 (Egusa & Masuda, 1971). It was later reported in estuarine fish, particularly grey mullet (*Mugil cephalus*) in eastern Australia in 1972 (Fraser *et al.*, 1992; Mckenzie & Hall, 1976). Infection with *A. invadans* has extended its range into South-East and South Asia, and into West Asia (Lilley *et al.*, 1998; Tonguthai, 1985). Outbreaks of ulcerative disease in menhaden (*Brevoortia tyrannus*) in North America had the same aetiological agent as the disease observed in Asia (Blazer *et al.*, 1999; Lilley *et al.*, 1997a; Vandersea *et al.*, 2006). The first confirmed outbreaks of infection with *A. invadans* on the African continent occurred in 2007, and were connected to the Zambezi-Chobe river system (Andrew *et al.*, 2008; FAO, 2009; Huchzermeyer & Van der Waal, 2012; McHugh *et al.*, 2014). In 2010 and 2011, infection with *A. invadans* appeared in wild freshwater fish in Southern Africa and in wild brown bullhead fish in North America. Infection with *A. invadans* has been reported from more than 20 countries in four continents: North America, Southern Africa, Asia and Australia.

---

See WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

There is no protective vaccine available.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

There is no effective treatment for *A. invadans*-infected fish in the wild and in aquaculture ponds.

### 2.4.3. Immunostimulation

Experimentally infected snakehead fish fed a vitamin-supplemented feed exhibited clinical signs of infection with *A. invadans* but had higher survival than controls (Miles *et al.*, 2001).

### 2.4.4. Breeding resistant strains

No data available.

### 2.4.5. Inactivation methods

To minimise fish losses in infected fish ponds water exchange should be stopped and lime or hydrated lime and/or salt should be applied (Lilley *et al.*, 1998). Preparing fish ponds by sun-drying and liming are effective disinfection methods for *A. invadans* (EFSA 2011b; Kumar *et al.*, 2020; Oidtmann, 2012). Similar to other oomycetes or water moulds, general disinfection chemicals effectively destroy *A. invadans* that might contaminate farms, fish ponds or fishing gear (Iberahim *et al.*, 2018).

### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

~~Routine~~ There are no published protocols for *A. invadans* disinfection of fish eggs and larvae against water moulds is effective against *A. invadans*. It should be noted that there is no report of the presence of *A. invadans* in fish eggs or larvae.

### 2.4.7. General husbandry

Control of *A. invadans* in natural waters is probably impossible. In outbreaks occurring in small, closed water bodies or fish ponds, treating water with agricultural limes and improving water quality, together with removal of infected fish, is often effective in reducing mortalities and controlling the disease. Preventing entry of water from *A. invadans*-infected water bodies into fish ponds can prevent spread of the disease into farms. Sodium chloride or salt and agricultural lime are safe and effective chemicals for treating or preventing the spread of *A. invadans*.

## 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Scoop net, cast net or seine net represent the best choices for catching diseased fish in natural waters or in fish ponds (FAO 2009).

Fish with characteristic EUS-like lesions should be sampled from affected populations

### 3.2. Selection of organs or tissues

The motile zoospore plays an important role in the spread of the disease. Once the motile spore attaches to the skin of the fish, the spore will germinate under suitable conditions and its hyphae will invade the fish skin, muscular tissue and reach the internal organs. Fish skeletal muscle is the target organ and exhibits major clinical signs of infection with *A. invadans* with mycotic granulomas (Iberahim *et al.*, 2018). Samples should not be taken from the middle of large lesions as these are likely to be devoid of visible and viable hyphae. Instead, samples should be taken from the leading edge of the infected area or lesion and where

---

possible, multiple samples should be taken from an infected individual to obtain viable hyphae. Fungal hyphae can be seen in tissue squash mounts and histological sections at the leading edge of the infected area. Attempting to culture *A. invadans* from severe ulcers is often constrained because of contaminating bacteria, but still should be attempted. PCR on tissue taken from the leading edge of the ulcer also should be attempted.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.2.5. of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish).

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Samples should not be taken from the middle of large lesions as these are likely to be devoid of visible and viable hyphae.

### 3.4. Non-lethal sampling

None available.

### 3.5. Preservation of samples for submission

Fish specimens should be transported to the laboratory live or in ice-cooled boxes for further diagnosis. Samples must not be frozen since the fungus *A. invadans* is killed by freezing. Fish collected from remote areas should be anaesthetised and can be fixed in normal 10% formalin or 10% phosphate-buffered formalin for at least 1–2 days. The fixed specimens are then transferred to double-layer plastic bags with formalin-moistened tissue paper.

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*.

#### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation depends strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory. Multiple samples should be taken from each lesion to increase the chances of obtaining viable hyphae.

#### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1.

#### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard methods for histopathology can be found in Chapter 2.3.0.

#### 3.5.4. Samples for other tests

None

### 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger animals should be processed and tested individually are available. However, smaller life stages (e.g. fry) can be pooled to provide a minimum amount of material for testing.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

---

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
<u>Squash mounts</u> <u>Clinical signs</u>	±	±	±	NA	+	+	+	NA				
<u>Squash mounts</u>					±	±	±	1	±	±	±	1
Histopathology					++	++	++	1	++	++	++	1
Cytopathology												
Cell or artificial media culture					++	++	++	1	+	+	+	1
Real-time PCR												
Conventional PCR					++	++	++	1				
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation									++	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Other antigen detection methods												
Other method												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH Pathway (Chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

Diagnosis of infection with *A. invadans* in clinically affected fish may be achieved by histopathology, oomycete isolation or polymerase chain reaction amplification.

#### 4.1. Squash mounts Observation for clinical signs

Using observational data of clinical signs (see Section 2.3.2 *Clinical signs, including behavioural changes*) for targeted surveillance, a sample of the fish population should be examined live with a sample size sufficient to meet survey design assumptions as described in Chapter 1.4 of the *Aquatic Code*. Surveys should be conducted during seasons that favour clinical manifestation of infection with *A. invadans* or when water temperatures are in the range 18–25°C.

#### 4.2. Squash mounts

*Aphanomyces invadans* can be detected using microscopic examination of squash preparations prepared as follows:

- i) Remove ulcer surface using a sharp scalpel blade.
- ii) Cut the muscular tissue at the edge of the ulcer.
- iii) Place the pieces of tissue on a cutting board then make thin slices using a sharp scalpel blade.
- iv) Place the thinly sliced tissue between two glass slides and squeeze gently with fingers.
- v) Remove one of the glass slides and cover the tissue with a cover-slip. View under a light microscope to find the nonseptate hyphae structure of *A. invadans* (12–25 µm in diameter).

#### 4.23. Histopathology and cytopathology

*Aphanomyces invadans* can be detected using microscopic examination of fixed sections, prepared as follows:

- i) Sample only live or moribund specimens of fish with clinical lesions.
- ii) Take samples of skin/muscle (<1 cm<sup>3</sup>), including the leading edge of the lesion and the surrounding tissue.
- iii) Fix the tissues immediately in 10% formalin. The amount of formalin should be 10 times the volume of the tissue to be fixed.

##### 4.23.1. Histological procedure

Standard methods for processing are provided in chapter 2.3.0. H&E and general fungus stains (e.g. Grocott's stain) will demonstrate typical granulomas and invasive hyphae.

##### 4.23.2 Histopathological changes

Early lesions are caused by erythematous dermatitis with no obvious oomycete involvement. *Aphanomyces invadans* hyphae are observed growing in skeletal muscle as the lesions progress from a mild chronic active dermatitis to a severe locally extensive necrotising granulomatous dermatitis with severe floccular degeneration of the muscle. The oomycete elicits a strong inflammatory response and granulomas are formed around the penetrating hyphae.

#### 4.34. Cell culture for isolation

##### 4.34.1. Isolation of *Aphanomyces invadans* from internal tissues

The following are two methods of isolation of *A. invadans* adapted from Lilley *et al.* (1998) and Willoughby & Roberts (1994).

Method 1: Moderate, pale, raised, dermal lesions are most suitable for oomycete isolation attempts. Remove the scales around the periphery of the lesion and sear the underlying skin with a red-hot spatula so as to sterilise the surface. Using a sterile scalpel blade and sterile fine-pointed forceps, cut through the stratum compactum underlying the seared area and, by cutting horizontally and reflecting superficial tissues, expose the underlying muscle. Ensure the instruments do not make contact with the contaminated external surface and thereby contaminate the underlying muscle. Using aseptic techniques, carefully excise pieces of affected muscle, approximately 2 mm<sup>3</sup>, and place on a Petri dish containing

glucose/peptone (GP) agar (see Table 4.1) with penicillin G (100 units ml<sup>-1</sup>) and streptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>). Seal plates, incubate at room temperature or at 25°C and examine daily. Repeatedly transfer emerging hyphal tips on to fresh plates of GP agar with antibiotics until cultures are free of contamination.

Method 2: Lesions located on the flank or tail of fish <20 cm in length can be sampled by cutting the fish in two using a sterile scalpel and slicing a cross-section through the fish at the edge of the lesion. Flame the scalpel until red-hot and use this to sterilise the exposed surface of the muscle. Use a small-bladed sterile scalpel to cut out a circular block of muscle (2–4 mm<sup>3</sup>) from beneath the lesion and place it in a Petri dish of GP medium (see Table 4.1) with 100 units ml<sup>-1</sup> penicillin G and 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin. Instruments should not contact the contaminated external surface of the fish. Incubate inoculated medium at approximately 25°C and examine under a microscope (preferably an inverted microscope) within 12 hours. Repeatedly transfer emerging hyphal tips to plates of GP medium with 12 g litre<sup>-1</sup> technical agar, 100 units ml<sup>-1</sup> penicillin G and 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin until axenic cultures are obtained. The oomycete isolate can also be maintained at 25°C on glucose/yeast extract (GY) agar (see Table 4.1) and transferred to a fresh GY agar tube once every 1–2 weeks (Hatai & Egusa, 1979).

#### 4.34.2. Identification of *Aphanomyces invadans*

*Aphanomyces invadans* does not produce any sexual structures and should thus not be diagnosed by morphological criteria alone. However, the oomycete can be identified to the genus level by inducing sporogenesis and demonstrating typical asexual characteristics of *Aphanomyces* spp., as described in Lilley *et al.*, 1998. *Aphanomyces invadans* is characteristically slow-growing in culture and fails to grow at 37°C on GPY agar (Table 4.1). Detailed temperature–growth profiles are given in Lilley & Roberts (1997). *A. invadans* can be identified by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the rDNA of *A. invadans*.

#### 4.34.3. Inducing sporulation in *Aphanomyces invadans* cultures

The induction of asexual reproductive structures is necessary for identifying oomycete cultures as members of the genus *Aphanomyces*. To induce sporulation, place an agar plug (3–4 mm in diameter) of actively growing mycelium in a Petri dish containing glucose/peptone/yeast (GPY) broth and incubate for 4 days at approximately 20°C. Wash the nutrient agar out of the resulting mat by sequential transfer through five Petri dishes containing autoclaved pond water (Table 4.4.3.1), and leave overnight at 20°C in autoclaved pond water. After about 12 hours, the formation of achlyoid clusters of primary cysts and the release of motile secondary zoospores should be apparent under the microscope.

**Table 4.4.3.1.** Media for isolation, growth and sporulation of *Aphanomyces invadans* cultures

GP (glucose/peptone) medium	GPY (glucose/peptone/yeast) broth	GPY agar	GY agar ( <u>glucose/ yeast</u> )	Autoclaved pond water
3 g litre <sup>-1</sup> glucose 1 g litre <sup>-1</sup> peptone 0.128 g litre <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.014 g litre <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.029 g litre <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 2.4 mg litre <sup>-1</sup> FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O 1.8 mg litre <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O 3.9 mg litre <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0.4 mg litre <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	GP broth + 0.5 g litre <sup>-1</sup> yeast extract	GPY broth + 12 g litre <sup>-1</sup> technical agar	1% glucose, 0.25% yeast extract, 1.5% agar	Sample pond/lake water known to support oomycete growth. Filter through Whatman 541 filter paper. Combine one part pond water with two parts distilled water and autoclave. pH to 6–7.

#### Agent purification

Maintaining *A. invadans* in the axenic culture is necessary. As it is characteristically slow-growing, it easily becomes contaminated with other micro-organisms, such as bacteria and other fast-growing oomycetes and fungi. Attempts to purify or isolate *A. invadans* from contaminated cultures usually fail.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 2.5 *Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*. Each sample should be tested in duplicate.

#### Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

##### 4.4.1. Real-time PCR

No real-time PCR methods for detecting *A. invadans* in fish tissues are available.

##### 4.4.2. Conventional PCR

DNA preparation from *A. invadans* isolate

DNA is extracted from an actively growing colony of *A. invadans* culture in GY broth at about 4 days or when young mycelia reach 0.5–1.0 cm in diameter. The mycelia are transferred to sterile 100-mm Petri dishes, washed twice with PBS and then placed on tissue paper for liquid removal. Hyphal tips (~50–250 mg) are excised with a sterile scalpel blade and transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube for DNA extraction. Commercial DNA extraction kits have been used successfully (Phadee *et al.*, 2004b; Vandersea *et al.*, 2006).

DNA preparation from *A. invadans*-infected tissue

Small pieces of *A. invadans*-infected tissue (25–50 mg) are suitable for DNA extractions (Phadee *et al.*, 2004a).

Diagnostic PCR technique

Three published techniques are specific to *A. invadans*. Oidtmann *et al.* (2008) demonstrated cross reactivity of the Phadee *et al.* (2004b) assay with *A. frigidophilus* when more than 10 ng of template DNA of *A. frigidophilus* was used in the PCR.

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1: Vandersea <i>et al.</i>, 2006; GenBank Accession No. AF396684; Product amplicon size: 234bp</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1)</u>	<u>Fwd Ainvad-2F: TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG</u> <u>Rev Ainvad-ITSR1: GCT-AAG-GTT-TCA-GTA-TGT-AG</u>	<u>0.025 nM</u> <u>0.025 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>95°C/30 sec, 56°C/45 sec, 95°C/30 sec,</u> <u>72°C/2.5 min, 95°C/30 sec</u>
<u>Method 2: Phadee <i>et al.</i>, 2004b; GenBank Accession No. AF396683-AF396684; Product amplicon size: 550bp</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1-ITS2)</u>	<u>Fwd ITS11: GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC</u> <u>Rev ITS23: CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA</u>	<u>500 nM</u> <u>500 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>94°C/30 sec, 65°C/45 sec, 72°C/1 min</u>
<u>Method 3: Oidtmann <i>et al.</i>, 2008; GenBank Accession No. EU422990; Product amplicon size: 564</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1-ITS2)</u>	<u>Fwd B073: CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC</u> <u>Rev B0639: ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC</u>	<u>600 nM</u> <u>600 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>96°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min</u>

The species-specific forward primer site is located near the 3' end of the SSU (small subunit) gene and a species-specific reverse primer site is located in the ITS1 region for Ainvad-2F (5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3') and Ainvad-ITSR1 (5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'). The PCR mixture contained 25 µM of each primer, 2.5 mM each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U of Platinum Taq DNA

---

polymerase and 20 ng of genomic DNA (either from an *Aphanomyces* isolate or from infected tissue) for a total volume of 50 µl. DNA is amplified in a thermocycle machine under the following cycle conditions: 2 minutes at 95°C; 35 cycles, each consisting of 30 seconds at 95°C, 45 seconds at 56°C, 2.5 minutes at 72°C; and a final extension of 5 minutes at 72°C. The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 234 bp (Vandersea *et al.*, 2006).

#### Method 2

The species-specific primer sites are located in the ITS1 and ITS2 regions. The forward primer is ITS11 (5'-GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC-3') and the reverse is ITS23 (5'-CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA-3'). The PCR mixture contains 0.5 µM of each primer, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 U of *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA (from an *Aphanomyces* isolate) for a total volume of 25 µl. The DNA is amplified under the following cycle conditions: 5 minutes at 94°C; 25 cycles, each consisting of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, 1 minute at 72°C; and a final extension of 5 minutes at 72°C. The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 550 bp. PCR amplification using the DNA template from the infected tissue is similar to the above protocol except that 5 ng of the DNA template is used for 35 cycles (Phadee *et al.*, 2004b).

#### Method 3

The species-specific primer sites are located in the ITS1 and ITS2 regions. The forward primer is BO73 (5'-CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC-3') and the reverse is BO639 (5'-ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). The PCR mixture contains 0.6 µM of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.625 units of *Taq* DNA polymerase, and approximately 5 ng of genomic DNA (or 2.5 µl of DNA template extracted from 25 mg of infected tissue and suspended in 100 µl buffer) in a 50 µl reaction volume (Oidtmann *et al.*, 2008). The DNA is amplified under the following cycle conditions: 96°C for 5 minutes; 35 cycles of 1 minute at 96°C, 1 minute at 58°C and 1 minute at 72°C; followed by a final extension at 72°C for 5 minutes (Oidtmann, pers. comm.). The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 564 bp.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None.

#### 4.5. Amplicon sequencing

Nucleotide sequencing of all conventional PCR amplicons (Section 4.4.2) is recommended as one of the final steps for confirmatory diagnosis. *Aphanomyces invadans*-specific sequences will share a high degree of nucleotide similarity to one of the published reference sequences for *A. invadans* (Genbank accession AF396684).

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

A fluorescent peptide nucleic acid *in-situ* hybridisation (FISH) technique has demonstrated a high specificity for *A. invadans*. The technique can directly detect the mycelia-like structure of the oomycete in thinly sliced tissues of affected organs of susceptible fish. The fluorescein (FLU) probe designed to hybridise the small subunit of the rRNA *A. invadans* (bp 621 to 635; GenBank acc. AF396684) is 5'-FLU-GTA-CTG-ACA-TTT-CGT-3' or Ainv-FLU3.

The *A. invadans* affected tissue is fixed and hybridised as soon as possible after the fish are collected to minimise RNA degradation. Tissue (~20 mg) is dissected from the periphery of the lesions with sterile scalpel blades and placed in individual wells of a 24 well microtitre plate. One ml ethanol-saline fixative (44 ml of 95% ethanol, 10 ml of deionised H<sub>2</sub>O, and 6 ml of 25 × SET buffer [3.75 M NaCl, 25 mM EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid), 0.5 M Tris/HCl, pH 7.8]) containing 3% polyoxyethyl-enesorbitan monolaurate (Tween 20) is added to enhance tissue permeabilisation. The microtitre plate is gently agitated at room temperature on an orbital shaker (30 rpm) for 1.5 hours. The fixed tissues are rinsed (twice for 15 minutes each time) with 0.5

---

ml of hybridisation buffer (5 × SET, 0.1% [v/v] Igepal-CA630 and 25 µg ml<sup>-1</sup> poly[A]) containing 3% Tween 20. The hybridisation buffer is removed, and the tissues are resuspended in 0.5 ml of hybridisation buffer containing 3% Tween 20 and 100 nM Ainv-FLU3 probe. “No probe” control specimens are incubated with 0.5 ml of hybridisation buffer/3% Tween 20. All tissues are incubated at 60°C for 1 hour in the dark. Following incubation, the tissues are rinsed twice with 1 ml of pre-warmed (60°C) 5 × SET buffer containing 3% Tween 20 to remove residual probe. The tissue specimens are mounted onto poly L lysine coated microscope slides. One drop of the light anti-fade solution is placed on the specimens, which are then overlaid with a cover slip. Analyses are performed by light and epifluorescence microscopy. The camera and microscope settings for epifluorescent analyses are held constant so that comparative analyses of relative fluorescence intensity can be made between probed and non probed specimens. The fluorescent oomycete hyphae appear as green fluorescence against the dark tissue background. The above detailed protocols are/were published by Vandersea *et al.* (2006). Using the FISH technique, *A. invadans* can be visualised very well in thinly sliced tissue compared with freshly squashed tissue.

#### 4.7. Immunohistochemistry

None.

#### 4.8. Bioassay

Fish can be experimentally infected by intramuscular injection of 0.1 ml suspension of 100+ motile zoospores into fish susceptible to infection with *A. invadans* at 20°C. Histological growth of aseptate hyphae, 12–25 µm in diameter, should be demonstrated in the muscle of fish sampled after 7 days, and typical mycotic granulomas should be demonstrated in the muscle of fish sampled after 10–14 days.

#### 4.9. Antibody or antigen detection methods

Polyclonal antibodies against *A. invadans* or *Aphanomyces* saprophyte showed cross-reactivity to each other using protein gel electrophoresis and Western blot analysis and immunohistochemistry. (Lilley *et al.*, 1997b). However, a specific monoclonal antibody against *A. invadans* developed later was found to have high specificity and high sensitivity to *A. invadans* using immunofluorescence. This monoclonal antibody could detect *A. invadans* hyphae at the early stage of infection (Miles *et al.*, 2003).

A monoclonal antibody-based flow-through immunoassay was developed by Adil *et al.* (2013). This assay was found to have high analytical (0.007mg ml<sup>-1</sup>) and diagnostic specificity comparable to PCR.

#### 4.10. Other methods

Serological methods for detection and identification of *A. invadans* in diseased specimens are not practical. If necessary, the monoclonal antibody offers a better specificity and sensitivity than polyclonal antibody for serological detection or identification of *A. invadans* in diseased specimens or in pathogen isolates.

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

The test for targeted surveillance to declare freedom from infection with *A. invadans* is examination of target populations for gross signs of infection with *A. invadans* (as described in Section 4.1 *Observation for clinical signs*). The test for targeted surveillance to declare freedom from infection with *A. invadans* is examination of target populations for gross signs of infection with *A. invadans*. Surveys should be conducted during seasons that favour clinical manifestation of infection with *A. invadans* or when water temperatures are in the range 18–25°C.

Using the gross sign test for targeted surveillance, a large sample of the fish population should be examined live with a sample size sufficient to meet survey design assumptions as described in Chapter 1.4 of the Aquatic Code.

If fish show gross signs consistent with infection with *A. invadans*, they should be categorised as suspect fish, and the location/farm/compartments/zone should be considered suspect. Suspect specimens should be further tested using the methods listed under presumptive diagnosis followed by confirmative diagnosis as described in the Table 4.1.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

---

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (6.1) or presence of clinical signs (6.2) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free. There are currently no WOA Reference Laboratories designated for EUS.

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status <sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. ~~Geographical~~ Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy populations

The presence of infection with *A. invadans* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Observation of clinical signs consistent with infection with *A. invadans*<sup>2</sup>
- ii) A positive result obtained by any of the diagnostic techniques described in Section 4.

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy populations

The presence of infection with *A. invadans* is considered to be confirmed if one or more of the following criteria is met:

- i) Histopathology consistent with infection with *A. invadans* and positive result by PCR and amplicon sequencing
- ii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and positive result for *in-situ* hybridisation
- iii) Artificial media culture and positive result by PCR and sequencing of the amplicon

## 6.2 Clinically affected animals

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *A. invadans* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with infection with *A. invadans* as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Positive result by a recommended molecular detection test
- iii) Histological changes consistent with infection with *A. invadans*
- iv) Visual observation of hyphae characteristic (direct or by microscopy) of *A. invadans*
- v) Culture and isolation of *A. invadans* type colonies

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *A. invadans* is considered to be confirmed if one or more of the following criteria is met:

- i) Visualisation of hyphae under squash mounts and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

<sup>2</sup> Note that surveillance of apparently healthy populations for EUS is based on examination of target populations for clinical signs of infection with *A. invadans* (see Section 5 Test[s] recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations).

- ii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- iii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and positive result for *in-situ* hybridisation
- iv) Artificial media culture and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- v) Positive result for *in-situ* hybridisation and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *A. invadans* is provided in Table 6.3.1. and 6.3.2. (no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with *A. invadans*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data is only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

#### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity.

#### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity.

## 7. References

- ADIL B., SHANKAR K.M., NAVEEN KUMAR B.T., PATIL R., BALLYAYA A., RAMESH K.S., POOJARY S.R., BYADGI O.V. & SIRIYAPPAGOUDE P. (2013). Development and standardization of a monoclonal antibody-based rapid flow-through immunoassay for the detection of *Aphanomyces invadans* in the field. *J. Vet. Sci.*, **14**, 413–419.
- AFZALI S.F., HASSAN M.D., ABDUL-RAHIM A.M., SHARIFPOUR I. & SABRI J. (2013). Isolation and identification of *Aphanomyces* species from natural water bodies and fish farms in Selangor, Malaysia. *Malaysian Appl. Biol.*, **42**, 21–31.
- ANDREW T., HUCHZERMAYER K., MBEHA B. & NENGU S. (2008). Epizootic ulcerative syndrome affecting fish in the Zambezi river system in Southern Africa. *Vet. Rec.*, **163**, 629–632.
- BALDOCK F.C., BLAZER V., CALLINAN R., HATAI K., KARUNASAGAR I., MOHAN C.V. & BONDAD-REANTASO M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. *In: Diseases in Asian Aquaculture V*, Walker P., Lester R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 555–585.
- BALASURIYA L.K.S.W. (1994). Epizootic ulcerative syndrome in fish in Sri Lanka, country status report. *In: Proceeding of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative*, Robert R.J., Campbell B. & MacRae I.H., eds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand, pp 39–47.

- 
- BLAZER V.S., VOGELBEIN W.K., DENSMORE C.L., MAY E.B., LILLEY J.H. & ZWERNER D.E. (1999). *Aphanomyces* as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 340–349.
- BONDAD-REANTASO M.G., LUMANLAN S.C., NATIVIDAD J.M. & PHILLIPS M.J. (1992). Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. *In: Diseases in Asian Aquaculture 1*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 475–490.
- CATAP E.S. & MUNDAY B.L. (1998). Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fish Pathol.*, **33**, 327–335.
- CAVALIER-SMITH T. & CHAO E.E.Y. (2006). Phylogeny and Megasytematics of Phagotrophic Heterokonts (Kingdom Chromista). *J. Mol. Evol.*, **62**, 388–420.
- CHINABUT S. & ROBERTS R.J. (1999). Pathology and Histopathology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Royal Thai Government, Bangkok, Thailand, 33 pp. ISBN 974-7604-55-8.
- CHINABUT S., ROBERTS R.J., WILLOUGHBY G.R. & PEARSON M.D. (1995) Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J. Fish Dis.*, **18**, 41–47.
- CRUZ-LACIERDA E.R. & SHARIFF M. (1995). Experimental transmission of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in snakehead, *Ophicephalus striatus*. *Dis. Asian Aquac.*, **11**, 327–336. DIEGUEZ-URIBEONDO J., GARCIA M.A., CERENIUS L., KOZUBÍKOVÁ E., BALLESTEROS I., WINDELS C., WEILAND J., KATOR H., SÖDERHÄLL K. & MARTÍN M.P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 365–376.
- EGUSA S. & MASUDA N. (1971). A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **6**, 41–46.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2011a). Scientific Opinion on Epizootic Ulcerative Syndrome. *EFSA J.*, **9**, 2387.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2011b). Report of the technical hearing meeting on Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). *EFSA Support. Publ.*, **8**, 1–16.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1986). Report of the expert consultation on ulcerative fish diseases in the Asia-Pacific region (TCP/RAS/4508). Bangkok, August 1986. FAO, Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2009). Report of the international emergency disease investigation task force on a serious fish disease in Southern Africa, 18–26 May 2007, FAO, Rome, Italy, 70 pp.
- FRASER G.C., CALLINAN R.B. & CALDER L.M. (1992). *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *J. Fish Dis.*, **15**, 173–181.
- GOMO C., HANYIRE T., MAKAYA P. & SIBANDA S. (2016). Outbreak of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in *Seranochromis robustus* fish species in Darwendale dam, Zimbabwe. *African J. Fish. Sci.*, **4**, 204–205.
- HANJAVANIT C. (1997). Mycotic granulomatosis found in two species of ornamental fishes imported from Singapore. *Mycoscience*, **38**, 433–436.
- HATAI K. & EGUSA S. (1979). Studies on pathogenic fungus of mycotic granulomatosis III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathol.*, **13**, 147–152.
- HATAI K., EGUSA S., TAKAHASHI S. & OOE K. (1977). Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis – I. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured-ayu infected with the disease. *Fish Pathol.*, **12**, 129–133.
- HATAI K., NAKAMURA K., AN RHA S., YUASA K. & WADA S. (1994). *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Fish Pathol.*, **29**, 95–99.
-

- 
- HAWKE J.P., GROOTERS A.M. & CAMUS A.C. (2003). Ulcerative Mycosis Caused by *Aphanomyces invadans* in Channel Catfish, Black Bullhead, and Bluegill from Southeastern Louisiana. *J. Aquat. Anim. Health.*, **15**, 120–127.
- HERBERT B., JONES J.B.B., MOHAN C.V. V. & PERERA R.P.P. (2019). Impacts of epizootic ulcerative syndrome on subsistence fisheries and wildlife. *Rev. Sci. Tech.*, **38**, 459–475.
- HUCHZERMAYER C.F., HUCHZERMAYER K.D.A., CHRISTISON K.W., MACEY B.M., COLLY P.A., HANG'OMBE B.M. & SONGE M.M. (2018). First record of epizootic ulcerative syndrome from the Upper Congo catchment: An outbreak in the Bangweulu swamps, Zambia. *J. Fish Dis.*, **41**, 87–94.
- HUCHZERMAYER K.D.A. & VAN DER WAAL B.C.W. (2012). Epizootic ulcerative syndrome: Exotic fish disease threatens Africa's aquatic ecosystems. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **83**, 1–6.
- IBERAHIM N.A., TRUSCH F. & VAN WEST P. (2018). *Aphanomyces invadans*, the causal agent of Epizootic Ulcerative Syndrome, is a global threat to wild and farmed fish. *Fungal Biol. Rev.*, **44**, 1–13.
- KHAN M.H., MARSHALL L., THOMPSON K.D., CAMPBELL R.E. & LILLEY J.H. (1998). Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the Oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**, 192–197.
- KIRYU Y., SHIELDS J.D., VOGELBEIN W.K., KATOR H. & BLAZER V.S. (2003). Infectivity and pathogenicity of the oomycete *Aphanomyces invadans* in Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 135–146.
- KUMAR P., SARKAR P., STEFI RAJU V., MANIKANDAN V., GURU A., ARSHAD A., ELUMALAI P. & AROCKIARAJ J. (2020). Pathogenicity and Pathobiology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Causing Fungus *Aphanomyces invadans* and Its Immunological Response in Fish. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, **28**, 358–375.
- LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J. (1998). ~~FALLIS A., LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J.~~ (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Bangkok: The Aquatic Animal Health Research Institute.
- LILLEY J.H., HART D., PANYAWACHIRA V., KANCHANAKHAN S., CHINABUT S., SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (2003). Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. *J. Fish Dis.*, **26**, 263–275.
- LILLEY J.H., HART D., RICHARDS R.H., ROBERTS R.J., CERENIUS L. & SODERHALL K. (1997a). Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. *Vet. Rec.*, **140**, 653–654.
- LILLEY J.H., PETCHINDA T. & PANYAWACHIRA V. (2001). *Aphanomyces invadans* zoospore physiology: 4. *In vitro* viability of cysts. *The AAHRI Newsletter*, **10**, 1–4.
- LILLEY J.H. & ROBERTS R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. *J. Fish Dis.*, **20**, 135–144.
- LILLEY J.H., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (1997b). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 187–197.
- LUMANLAN-MAYO S.C., CALLINAN R.B., PACLIBARE J.O., CATAP E.S. & FRASER, G.C. (1997). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993-1995. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 129–138.
- McHUGH K.J., CHRISTISON K.W., WEYL O.L.F. & SMIT N.J. (2014). Histological Confirmation of Epizootic Ulcerative Syndrome in Two Cyprinid Species from Lake Liambezi, Zambezi Region, Namibia. *African Zool.*, **49**, 311–316.
- McKENZIE R.A. & HALL W.T.K. (1976). Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust. Vet. J.*, **52**, 230–231.
- MILES D.J.V., POLCHANA J., LILLEY J.H., KANCHANAKHAN S., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, **195**, 1–15.
-

- 
- MILES D.J.C., THOMPSON K.D., LILLEY J.H. & ADAMS A. (2003). Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 77–84.
- NOGA E.J. & DYKSTRA M.J. (1986). Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *J. Fish Dis.*, **9**, 47–53.
- OIDTMANN B. (2012). Review of biological factors relevant to import risk assessments for epizootic ulcerative syndrome (*Aphanomyces invadans*). *Transbound. Emerg. Dis.*, **59**, 26–39.
- OIDTMANN B., STEINBAUER GEIGER S. & HOFFMANN R.W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 185–207.
- PAGRUT N.K., GANGULY S., JAISWAL V. & SINGH C. (2017). An overview on epizootic ulcerative syndrome of fishes in India: A comprehensive report. *J. Entomol. Zool. Stud.*, **5**, 1941–1943.
- PHADEE P., KURATA O. & HATAI K. (2004a). A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **39**, 25–31.
- PHADEE, P., KURATA, O., HATAI K., HIRONO I. & AOKI T. (2004b). Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 220–230.
- PRADHAN P.K., MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KUMAR B.M. & DEVARAJA G. (2007). Yearlings of Indian major carps resist infection against the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Current Science*, **92**, 1430–1434.
- TONGUTHAI K. (1985). A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute, Bangkok, Thailand, 39 pp.
- TSUI C.K.M., MARSHALL W., YOKOYAMA R., HONDA D., LIPPMEIER J.C., CRAVEN K.D., PETERSON P.D. & BERBEE M.L. (2009). Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **50**, 129–140.
- VANDERSEA M.W., LITAKER R.W., YONNISH B., SOSA E., LANDSBERG J.H., PULLINGER C., MOON-BUTZIN P., GREEN J., MORRIS J.A., KATOR H., NOGA E.J. & TESTER P.A. (2006). Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1551–1557.
- VISHWANATH T., MOHAN C. & SHANKAR K. (1998). Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS), associated with a fungal pathogen, in Indian fishes: histopathology – ‘a cause for invasiveness’. *Aquaculture*, **165**, 1–9.
- WADA S., AN RHA S., KONDOH T., SUDA H., HATAI K. & ISHII H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **31**, 71–80.
- WILLOUGHBY L.G. & ROBERTS R.J. (1994). Improved methodology for isolation of the *Aphanomyces* fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. *J. Fish Dis.*, **17**, 541–543.

\*  
\* \*

**NB:** There is currently (2022) no WOA Reference Laboratories for infection with *Aphanomyces invadans* (please consult the WOA web site for the most up-to-date list: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

**NB:** FIRST ADOPTED IN 1995 AS EPIZOOTIC ULCERATIVE SYNDROME;  
MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2013.

CHAPTER 2.3.2.

INFECTION WITH EPIZOOTIC  
HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

---

1. Scope

Infection with epizootic haematopoietic necrosis virus means infection with the pathogenic agent *epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV) of the Genus *Ranavirus* of the Family *Iridoviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

EHNV is a species of the genus *Ranavirus* in the Family *Iridoviridae* (Chinchar *et al.*, 2005). In addition to fish, ranaviruses have been isolated from healthy or diseased frogs, salamanders and reptiles in America, Europe and Australia (Chinchar, 2002; Drury *et al.*, 2002; Fijan *et al.*, 1991; Hyatt *et al.*, 2002; Speare & Smith, 1992; Whittington *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 1968; Zupanovic *et al.*, 1998). Ranaviruses have large (150–180 nm), icosahedral virions, a double-stranded DNA genome (150–170 kb), and replicate in both the nucleus and cytoplasm with cytoplasmic assembly (Chinchar *et al.*, 2005).

Since the recognition of disease due to EHNV in Australia in 1986, similar systemic necrotising iridovirus syndromes have been reported in farmed fish. These include catfish (*Ictalurus melas*) in France (European catfish virus, ECV) (Pozet *et al.*, 1992), sheatfish (*Silurus glanis*) in Germany (European sheatfish virus, ESV) (Ahne *et al.*, 1989; 1990), turbot (*Scophthalmus maximus*) in Denmark (Bloch & Larsen, 1993), and cod (*Gadus morhua*) in Denmark (Cod iridovirus, CodV) (Ariel *et al.*, 2010). EHNV, ECV, ESV, and CodV share >98% nucleotide identity across concatenated sequences across the RNR- $\alpha$ , DNApol, RNR- $\beta$ , RNase II and MCP gene regions (Ariel *et al.*, 2010).

EHNV and ECV can be differentiated using genomic analysis (Ahne *et al.*, 1998; Holopainen *et al.*, 2009; Hyatt *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 1996; 1997; Marsh *et al.*, 2002). This enables epidemiological separation of disease events in finfish in Australia (EHNV) and Europe (ECV), and differentiation of these from ranavirus occurrences in amphibians.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

EHNV can persist in frozen fish tissues for more than 2 years (Langdon, 1989) and frozen fish carcasses for at least a year (Whittington *et al.*, 1996).

2.1.3. Survival and stability outside the host

EHNV is resistant to drying and remained infective for 97 days at 15°C and 300 days at 4°C in water (Langdon, 1989). For these reasons, it is presumed that EHNV would persist for months to years on a fish farm in water and sediment, as well as on plants and equipment.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with EHNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are:

Family	Scientific name	Common name
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Northern pike
Galaxiidae	<i>Galaxias olidus</i>	Mountain galaxias
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	Black bullhead
Melanotaeniidae	<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	Crimson spotted rainbow fish
Percidae	<i>Perca fluviatilis</i>	European perch
	<i>Sander lucioperca</i>	Pike-perch
Percichthyidae	<i>Macquaria australasica</i>	Macquarie perch
Poeciliidae	<i>Gambusia holbrooki</i>	Eastern mosquito fish
	<i>Gambusia affinis</i>	Mosquito fish
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Terapontidae	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Silver perch

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with EHNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: none known.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: Atlantic salmon (*Salmo salar*), freshwater catfish (*Tandanus tandanus*), golden perch (*Macquaria ambigua*), Murray cod (*Maccullochella peelii*) and purple spotted gudgeon (*Mogurnda adspersa*).

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Natural infections and disease have been limited to European perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Australia. The disease is more severe in European perch and in juveniles compared with adult fish (Whittington *et al.*, 2010). There are no descriptions of infection of eggs or early life stages of any other fish species.

For the purposes of Table 4.1, larvae and fry up to approximately 5 g in weight may be considered to be early life stages, fingerlings and grower fish up to 500 g may be considered to be juveniles, and fish above 500 g may be considered to be adults.

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Target organs and tissues infected with the virus are kidney, spleen and liver. It is not known if EHNV can be detected in gonadal tissues, ovarian fluid or milt or whether these tissues are suitable for surveillance of broodstock.

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

#### None known

**Rainbow trout:** The high case fatality rate and low prevalence of infection with EHNV in natural infections in rainbow trout means that the recruitment rate of carriers is likely to be very low (<2%) (Whittington *et al.*, 1994). EHNV has been detected in growout fish but histopathological lesions consistent with infection with EHNV indicated an active infection rather than a carrier state (Whittington *et al.*, 1999). Anti EHNV serum antibodies were not detected in fingerlings during or after an outbreak but were detected in a low proportion of growout fish, hence, it is uncertain whether these were survivors of the outbreak (Whittington *et al.*, 1994; 1999). There are data for European stocks of rainbow trout in experimental infections where potential carriers were identified (Ariel & Bang Jensen, 2009).

**European perch:** EHNV was isolated from 2 of 40 apparently healthy adult European perch during epizootics in juveniles in Victoria, Australia (Langdon & Humphrey, 1987), but as the incubation period extends for up to 28 days (Whittington & Reddacliff, 1995), these fish may have been in the preclinical phase.

---

### 2.2.6. Vectors

~~None demonstrated. Birds are potential vectors for EHN, it being carried in the gut, on feathers, feet and the bill (Whittington *et al.*, 1996).~~

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

*Rainbow trout:* It appears that under natural farm conditions EHN is poorly infective but once infected, most fish succumb to the disease ~~has a high case fatality rate~~. Infection with EHN may be present on a farm without causing suspicion because the mortality rate may not rise above the usual background rate. Infection with EHN has most often been reported in young fingerlings <125 mm fork length with daily mortality of less than 0.2% and total mortality of up to 4%. However, rainbow trout of all ages may be susceptible, although infection has not yet been seen in broodstock (Whittington *et al.*, 1994; 1999). There is a low direct economic impact because of the low mortality rate. Differences in susceptibility between European and Australian stocks of rainbow trout may exist (Ariel & Bang Jensen, 2009).

*European perch:* There is a very high rate of infection and mortality in natural outbreaks that, over time, leads to loss in wild fish populations (Langdon & Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1996). Experimental bath inoculation with as few as 0.08 TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> was lethal, and doses too low to be detected by virus isolation in BF-2 cells were fatal by intraperitoneal inoculation (Whittington & Reddacliff, 1995). European perch from distinct geographical areas with and without a history of EHN have been tested under experimental conditions and have demonstrated susceptibility to EHN (Becker *et al.*, 2016). Differences in susceptibility between European and Australian stocks of European perch may exist (Ariel & Bang Jensen, 2009).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Moribund fish may have loss of equilibrium, flared opercula and may be dark in colour (Reddacliff & Whittington, 1996). Clinical signs are usually more obvious in fingerlings and juvenile fish than adults of both rainbow trout and European perch. There may be clinical evidence of poor husbandry practices, such as overcrowding and suboptimal water quality, manifesting as skin, fin and gill lesions (Reddacliff & Whittington, 1996).

### 2.3.3 Gross pathology

There may be no gross lesions in affected fish. A small proportion of fish may have enlargement of kidney, liver or spleen. There may be focal white to yellow lesions in the liver corresponding to areas of necrosis (Reddacliff & Whittington, 1996).

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

*Rainbow trout:* EHN has spread between rainbow trout farms by transfer of infected fingerlings and probably transport water (Langdon *et al.*, 1988; Whittington *et al.*, 1994; 1999). The low prevalence of infection in rainbow trout means that active infection can easily go unrecognised in a population and be spread by trading fish. There are no data on possible vertical transmission of EHN on or within ova, and disinfection protocols for ova have not been evaluated. EHN has not yet been isolated from ovarian tissues or from broodstock. Annual recurrence in farmed rainbow trout may be due to reinfection of successive batches of fish or from wild European perch present in the same catchment.

*European perch:* The occurrence of infection with EHN in European perch in widely separated river systems and impoundments suggested that EHN was spread by translocation of live fish or bait by recreational fishers (Becker *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2010).

The route of infection is unknown. European perch and rainbow trout are susceptible to immersion exposure. The virus infects a range of cell types including hepatocytes, haematopoietic cells and endothelial cells in many organs (Reddacliff & Whittington, 1996). Virus is shed into water from infected tissues and carcasses as they disintegrate.

### 2.3.5. Environmental factors

*Rainbow trout:* Outbreaks appear to be related to poor husbandry, particularly overcrowding, inadequate water flow and fouling of tanks with feed. Damage to skin may provide a route of entry for EHN. Outbreaks have been seen on farms at water temperatures ranging from 11 to 20°C (Whittington *et al.*, 1994; 1999). The incubation period after intraperitoneal inoculation was 3–10 days at 19–21°C compared with 14–32 days at 8–10°C (Whittington & Reddacliff, 1995).

---

*European perch*: Natural epizootics of infection with EHNV affecting juvenile and adult European perch occur mostly in summer (Langdon & Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1994). It has been assumed that the disease in juvenile fish is related to the annual appearance of large numbers of non-immune young fish and their subsequent exposure to the virus while schooling in shallow waters; adults are uncommonly involved in these outbreaks. It is possible that environmental temperature is the trigger for outbreaks as juvenile fish feed in warm shallow waters on planktonic fauna, whereas adults feed on benthic invertebrates and larger prey in deeper cooler water (Whittington & Reddacliff, 1995). Experimentally, the incubation period ranged from 10 to 28 days at 12–18°C compared with 10–11 days at 19–21°C, and adult perch were refractory to infection at temperatures below 12°C (Whittington & Reddacliff, 1995). European stocks of European perch also displayed temperature-dependent susceptibility (Ariel & Bang Jensen, 2009).

#### 2.3.6. Geographical distribution

Infection with EHNV has been reported from rainbow trout farms within two river catchments in New South Wales, Australia (Whittington *et al.*, 2010). Infection with EHNV is endemic in south-eastern Australia, with a discontinuous distribution and sporadic outbreaks involving small numbers of European perch (Becker *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2010).

See WOAHS WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

### 2.4. Biosecurity and disease control strategies

Not available.

#### 2.4.1. Vaccination

None available.

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

None available.

#### 2.4.3. Immunostimulation

None available.

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

There has been no formal breeding programme for resistant strains of susceptible species. However, experimental trials using bath exposure have shown that European perch from water bodies in New South Wales, Australia with previous EHNV infections showed lower mortality compared with European perch from neighbouring and distant water bodies in Australia that have no previous history of EHNV (Becker *et al.*, 2016).

#### 2.4.5. Inactivation methods

EHNV is susceptible to 70% ethanol, 200 mg litre<sup>-1</sup> sodium hypochlorite or heating to 60°C for 15 minutes (Langdon, 1989). Data for the inactivation of amphibian ranavirus may also be relevant: 150 mg/litre chlorhexidine and 200 mg/litre potassium peroxydisulphate were effective after 1 minute contact time (Bryan *et al.*, 2009). If it is first dried, EHNV in cell culture supernatant is resistant to heating to 60°C for 15 minutes (Whittington *et al.*, 2010).

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not tested.

#### 2.4.7. General husbandry

Disease control in rainbow trout at the farm level relies on reducing the impact of infection by maintaining low stocking rates and adequate water quality. Investigations on one rainbow trout farm indicated that ponds with high stocking rates and low water flow, and thus poorer water quality, may result in higher levels of clinical disease compared with ponds on the same farm with lower stocking rates and higher water flow (Whittington *et al.*, 1994). The mechanism of protection may be through maintenance of healthy integument (Whittington *et al.*, 1994).

---

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples which are most likely to be infected.

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Clinical inspections should be carried out during a period when water temperature is conducive to development of clinical disease (see Section 2.3.5). All production units (ponds, tanks, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. For the purposes of disease surveillance, fish to be sampled are selected as follows:

- i) The most susceptible species (~~e.g. rainbow trout and European perch~~) should be sampled preferentially i.e. European perch where these are available, otherwise rainbow trout or the other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally.
- ii) Risk-based criteria should be employed to preferentially sample epidemiological units lots or populations with a history of abnormal mortality, potential exposure events or where there is evidence of poor water quality or husbandry. If more than one water source is used for fish production, fish from all water sources should be included in the sample.
- iii) If weak, abnormally behaving or freshly dead fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present, the fish selected should include normal appearing apparently healthy fish collected in such a way that all parts of the farm or affected waterbody as well as all year classes are proportionally represented in the sample.

For disease outbreak investigations, moribund fish or fish exhibiting clinical signs of infection with EHNIV should be collected. Ideally fish should be collected while alive, however recently dead fish can also be selected for diagnostic testing. It should be noted however, that there will be a significant risk of contamination with environmental bacteria if the animals have been dead for some time.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

Liver, anterior kidney and spleen from individual fish are pooled (Jaramillo *et al.*, 2012).

#### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Inappropriate tissues include gonads, gonadal fluids, milt and ova, ~~since because~~ there is no evidence of reproductive tract infection.

#### 3.4. Non-lethal sampling

Non-lethal samples (blood, fin, gill, integument or mucous) are unsuitable for testing EHNIV. Not applicable.

#### 3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0.

##### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

For recommendations on transporting samples for virus isolation to the laboratory, see Section B.2.4 of Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*.

##### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

~~Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undistilled) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen. Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.2.5 of Chapter 2.3.0. General information (diseases of fish).~~

---

### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

~~Tissue samples for histopathology should be fixed immediately after collection in 10% neutral buffered formalin. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1. Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 2.2 of Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*.~~

### 3.5.4. Samples for other tests

Not recommended for routine diagnostic testing.

## 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. If the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, larger fish should be processed and tested individually. Small life stages such as fry or specimens can be pooled to provide the minimum amount of material needed for testing. ~~If pooling is used, it is recommended to pool organ pieces from a maximum of five fish.~~

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for ~~identifying infection pathogen detection~~ that can be used in i) surveillance of apparently healthy ~~populations—animals~~, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

The designations used in the Table indicate:

~~**Ratings against for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating against for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, availability, cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:~~

**Key:**

- +++ = ~~Most suitable~~ Methods —are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = ~~Suitable~~ Method(s) are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = ~~Less suitable~~ Methods —are suitable, but performance or operational characteristics may significantly limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

~~The selection of a test for a given purpose depends on the analytical and diagnostic sensitivities and specificities, repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay analytical sensitivity or analytical specificity, such as tissue components inhibiting amplification, presence of nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.~~

~~**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.~~

~~WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.~~

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology					++	++	++	1				
Cytopathology												
Cell culture	+ ++	+ ++	++ +	<u>2-1</u>	++ +	++ +	+++	<u>2-1</u>	± +	± +	++	<u>2-1</u>
Immunohistochemistry					+	+	+	1				
Real-time PCR	+++	+++	+++	<u>2-1</u>	+++	+++	+++	2	++	++	++	<u>2-1</u>
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	±
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	<u>3-1</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA			+	1								
Ag-ELISA	+	+	+	1	+	+	+	1				
Other antigen detection methods <sup>3</sup>												
Other method <sup>3</sup>												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

---

#### 4.1. Wet mounts

Not applicable.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

*Light microscopy:* routine methods can be used for tissue fixation, such as in 10% buffered neutral formalin, paraffin embedding, preparation of 4–10 µm sections and staining with H&E to demonstrate tissue necrosis and basophilic intracytoplasmic inclusion bodies. These inclusion bodies are indicative but not confirmatory for infection with EHNV. Formalin-fixed paraffin-embedded sections can also be stained using an immunoperoxidase method (see below) to identify EHNV antigen associated with necrotic lesions.

Acute focal, multifocal or locally extensive coagulative or liquefactive necrosis of liver, haematopoietic kidney and spleen are commonly seen in routine haematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of formalin-fixed material. A small number of basophilic intracytoplasmic inclusion bodies may be seen, particularly in areas immediately surrounding necrotic areas in the liver and kidney. Necrotic lesions may also be seen in heart, pancreas, gastrointestinal tract, gill and pseudobranch (Reddacliff & Whittington, 1996).

Affected tissues (e.g. kidney, liver and spleen) contain cells exhibiting necrosis. Cells contain conspicuous cytoplasmic inclusions that are rarefied areas of the cytoplasm in which the viruses are assembled. ~~Within the cytoplasm, aggregates (paracrystalline arrays) of large (175 nm ± 6 nm) nonenveloped icosahedral viruses are apparent; single viruses are also present. Complete viruses (containing electron dense cores) bud/egress from the infected cells through the plasma membrane.~~ The nuclei of infected cells are frequently located peripherally and are distorted in shape.

#### 4.3. Cell culture for isolation

##### 4.3.1. Preparation of fish tissues for virus isolation

A simple method for preparation of fish tissues for cell culture and ELISA has been validated (Whittington & Steiner, 1993) (see sampling Section 3).

- i) Freeze tubes containing tissues at –80°C until needed.
- ii) Add 0.5 ml of homogenising medium (minimal essential medium Eagle, with Earle’s salts with glutamine) [MEM] with 200 International Units [IU] ml<sup>-1</sup> penicillin, 200 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 4 µg ml<sup>-1</sup> amphotericin B) to each tube. Grind tissue to a fine mulch with a sterile fitted pestle.
- iii) Add another 0.5 ml of homogenising medium to each tube and mix with a pestle.
- iv) Add three sterile glass beads to each tube (3 mm diameter) and close the lid of the tube.
- v) Vortex the suspension vigorously for 20–30 seconds and place at 4°C for 2 hours.
- vi) Vortex the suspension again as above and centrifuge for 10 minutes at 2500 *g* in a benchtop microcentrifuge.
- vii) Transfer the supernatant, now called clarified tissue homogenate, to a fresh sterile tube. Homogenates may be frozen at –80°C until required for virus isolation and ELISA.

##### 4.3.2. Cell ~~culture-lines for virus isolation/artificial media~~

EHNV ~~grows-replicates~~ well in many fish cell lines including BF-2 (bluegill fry ATCC CCL 91), FHM (fathead minnow; ATCC CCL 42), EPC (*epithelioma papulosum cyprini* [Cinkova *et al.*, 2010]), and CHSE-214 (Chinook salmon embryo cell line; ATCC CRL 1681) at temperatures ranging from 15 to 22°C (Crane *et al.*, 2005). Incubation temperatures of 20°C or 24°C result in higher titres than 15°C; ~~and BF-2, EPC, or CHSE 214 incubated at 22°C and BF-2 EPC or CHSE 214 cells~~ are recommended to maximise titres, which might be important for the detection of low numbers of viruses in fish tissues (Ariel *et al.*, 2009). BF-2 cells are preferred by the WOAHP Reference Laboratory with an incubation temperature of 22°C. The procedure for BF-2 cells is provided below. A procedure for CHSE-214 cells is provided under immunoperoxidase staining below (Section 4.7). ~~The identity of viruses in cell culture is determined by immunostaining, ELISA, immuno-electron microscopy, PCR and amplicon sequencing.~~

##### 4.3.3. Cell culture technical procedure

---

*Samples:* tissue homogenates.

Cells are cultured (in flasks, tubes or multi-well plates) with growth medium (MEM + 10% fetal calf-bovine serum [FCBS] with 100 IU ml<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 2 µg ml<sup>-1</sup> amphotericin B). The cells are incubated until almost confluent at 22°C, which can take up to 4 days depending on the seeding rate. Medium is changed to a maintenance medium (MEM with 2% FCBS and 100 IU ml<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 2 µg ml<sup>-1</sup> amphotericin B) on the day of inoculation. A 1/10 dilution using homogenising medium is made of single or pooled homogenates. Each culture is inoculated with 100 µl of sample per ml of culture medium. This represents a final 1/100 dilution of a 0.1 mg ml<sup>-1</sup> tissue homogenate. A further 1/10 dilution is made representing a final 1/1000 dilution, and two cultures are inoculated. No adsorption step is used. As an alternative, two to three cultures can be inoculated directly with 10 µl undiluted homogenate per ml of culture medium. Note that a high rate of cell toxicity or contamination often accompanies the use of a large undiluted inoculum. The cultures are incubated at 22°C in an incubator for 6 days. Cultures are read at days 3 and day 6. Cultures are passed at least once to detect samples with low levels of virus. On day 6, the primary cultures (P1) are frozen overnight at -20°C, thawed, gently mixed and then the culture supernatant is inoculated onto fresh cells as before (P2), i.e. 100 µl P1 supernatant per ml culture medium. Remaining P1 supernatants are transferred to sterile 5 ml tubes and placed at 4°C for testing by ELISA or PCR or another means to confirm the cause of cytopathic effect (CPE) as EHN. P2 is incubated as above, and a third pass is conducted if necessary.

#### 4.3.4. Interpretation of results

CPE is well developed and consists of focal lysis surrounded by rounded granular cells. This change extends rapidly to involve the entire monolayer, which detaches and disintegrates. Cell cultures can be tested for EHN DNA using real-time PCR and conventional PCR with sequence analysis as described in Section 4.4. Antigen can be detected using immunocytochemistry in cell cultures with polyclonal antibodies and protocol available from the reference laboratory.

The identity of viruses in cell culture is determined by PCR and amplicon sequencing.

Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

Although several conventional PCR or quantitative real-time PCR methods have been described for the detection of ranaviruses (Jaramillo *et al.*, 2012; Pallister *et al.*, 2007; Stilwell *et al.*, 2018), EHN can only be detected when these methods are combined with methods that specifically detect EHN, none has been adequately validated according to OIE guidelines for primary detection of EHN. However, identification of ranavirus at genus and species level is possible using several published PCR strategies.

Samples can be screened by real-time PCR, but as the assays described are not specific for EHN, identification of EHN by conventional PCR and amplicon sequencing must be undertaken on any samples screening positive by real-time PCR. For testing by conventional PCR, two PCR assays using MCP primers are used with amplicon sequencing required to differentiate EHN from ECV, FV3 and BIV (Marsh *et al.*, 2002). Alternatively, PCR of the DNA polymerase gene and neurofilament triplet H1-like protein genes can be used (Holopainen *et al.*, 2011) (this method is not described in this chapter).

*Samples:* virus from cell culture or direct analysis of tissue homogenate.

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 2.5 Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish). Each diagnostic sample should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots.

##### Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

##### 4.4.1. Real-time PCR

The ranavirus real-time screening protocol in use at the WOA Reference Laboratory is based on Pallister *et al.*, 2007. Alternative real-time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHNV and other ranaviruses. The assay described by Jaramillo *et al.* (2012) uses SYBR Green detection chemistry and the assay described by Stilwell *et al.* (2018) detects multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

Tissue samples can be homogenised by manual pestle grinding or by bead beating (Rimmer *et al.*, 2012). Commercially available nucleic acid extraction kits (e.g. spin columns, magnetic beads) may be used to extract DNA directly from tissues and from tissue homogenates and cell culture supernatants. Depending on the number of samples to be tested, in the OIE Reference Laboratory, nucleic acids are extracted with either the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) or MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. A negative extraction control, consisting of extraction reagents only, is included when test samples are extracted.

The ranavirus real-time screening protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Pallister *et al.*, 2007 is as follows; Template (2 µl) is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM for each primer, 250 nM for probe, and molecular grade water. After 1 cycle of 50°C for 2 minutes and 95 °C for 10 minutes, PCR amplification consists of 45 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds.

Alternative real-time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHNV and other ranaviruses. The assay described by Jaramillo *et al.* (2012) uses SYBR Green detection chemistry and the assay described by Stilwell *et al.* (2018) was designed to detect multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

**Table 4.4.1.1. Ranavirus primer and probe sequences**

Primer	Sequence (5'–3')	Reference
RANA CON F RANA CON R Probe RANA CON Pr Primer	5' CTC ATC GTT CTG GCC ATC A 3' 5' TCC CAT CGA GCC GTT CA 3' 5' 6FAM CAC AAC ATT ATC CGC ATC MGB 3'	Pallister <i>et al.</i> , 2007
C1096 C1097 Primer	GAC TGA CCA ACG CCA GCC TTA ACG GCG GTG GTG TAC CCA GAG TTG TCG	Jaramillo <i>et al.</i> , 2012
RanaF1 RanaR1 Probe RanaP1	CCA GCC TGG TGT ACG AAA ACA ACT GGG ATG GAG GTG GCA TA 6FAM TGG GAG TCG AGT ACT AC MGB	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

**Primer and probe sequences**

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Pallister <i>et al.</i> , 2007); GenBank Accession No.: DQ457105			
Ranavirus/MCP	Fwd: RANA CON: CTC-ATC-GTT-CTG-GCC-ATC-A Rev: RANA CON: TCC-CAT-CGA-GCC-GTT-CA Probe: RANA CON Pr FAM-CAC-AAC-ATT-ATC-CGC-ATC-MGB	900 nM for each primer, 250 nM for probe	45 cycles of 95°C/15 sec; 60°C/60 sec

<b>Method 2 (Jaramillo <i>et al.</i>, 2012); GenBank Accession No.:</b>			
<b>Ranavirus/MCP</b>	<b>C1096</b> <b>GAC-TGA-CCA-ACG-CCA-GCC-TTA-ACG</b> <b>C1097</b> <b>GCG-GTG-GTG-TAC-CCA-GAG-TTG-TCG</b>	<b>12.5 pM for each primer</b>	<b>40 cycles of 95°C/30 sec; 58°C/30 sec</b>
<b>Method 3 (Stilwell <i>et al.</i>, 2018); GenBank Accession No.:</b>			
<b>Ranavirus/MCP</b>	<b>Fwd: RanaF1:</b> <b>CCA-GCC-TGG-TGT-ACG-AAA-ACA</b> <b>Rev: RanaR1</b> <b>ACT-GGG-ATG-GAG-GTG-GCA-TA</b> <b>Probe: RanaP1</b> <b>FAM-TGG-GAG-TCG-AGT-ACT-AC-MGB</b>	<b>900 nM for each primer, 250 nM for probe</b>	<b>40 cycles of 95°C/30 sec; 60°C/45 sec</b>

The ranavirus real time screening protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Pallister *et al.*, 2007. Alternative real time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHNV and other ranaviruses. The assay described by Jaramillo *et al.* (2012) uses SYBR Green detection chemistry and the assay described by Stilwell *et al.* (2018) detects multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

Details of the controls to be run with each assay are set out in Section 5.5. of Chapter 2.2.1. of Section 2.2.

#### 4.4.2. Conventional PCR

PCR and restriction endonuclease analysis (REA): technical procedure

Amplified product from PCR assay MCP-1 digested with PflM I enables differentiation of EHNV and BIV from FV3 and ECV. Amplified product from PCR assay MCP-2 digested with Hinc II, Acc I and Fnu4H I (individually) enables differentiation of EHNV and BIV from each other and from FV3 and ECV. **Both MCP1 and MCP2 target a region within the capsid protein gene (Marsh *et al.*, 2002).**

Preparation of reagents

EHNV purified DNA and BIV purified DNA PCR control reagents are supplied by the reference laboratory in freeze dried form. Reconstitute using 0.5 ml of Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and allow the vial to stand at RT for 2 minutes. Mix the vial very gently. For routine use, as a PCR control, it is recommended that working stocks be prepared as a 1/10 dilution in TE buffer (pH 8.0). Aliquots of 250 µl should be stored at -20°C. Each aliquot is sufficient for at least 50 reactions (1 to 5 µl added to cocktail) and has a minimum shelf life of 6 months from date of diluting.

Primers M151 and M152 (MCP-1, 321 bp), M153 and M154 (MCP-2, 625 bp) are supplied in working strength (100 ng µl<sup>-1</sup>) and should be stored at -20°C. Primers can also be ordered from commercial suppliers. For primer sequences, refer to Table 4.4.2.1.

**Table 4.4.2.1. MCP-1 and MCP-2 primer sequences**

PCR assay	Primer	Sequence (5'-3')	Product size	Gene location
MCP-1	M151	AAC CCG GCT TTC GGG CAG CA	321 bp	266-586
	M152	CGG GGC GGG GTT GAT GAG AT		
MCP-2	M153	ATG ACC GTC GCC CTC ATC AC	625 bp	842-1466
	M154	CCA TCG AGC CGT TCA TGA TG		

PCR cocktail

Amplification reactions in a final volume of 50 µl (including 5 µl DNA sample) contain 2.5 µl (250 ng) of each working primer, 200 µM of each of the nucleotides dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 5 µl of 10 × PCR buffer (66.6 mM Tris/HCl, 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.65 mg ml<sup>-1</sup> BSA, 10 mM beta-mercaptoethanol) and 2 U Taq polymerase. Instructions on preparation of 10 × PCR buffer are included in Table 4.4.2.2.

**Table 4.4.2.2. 10 × PCR buffer preparation**

Ingredients	Amount	Final concentration in 50 µl PCR mix
Tris	4.050 g	66.6 mM
Ammonium sulphate	1.100 g	16.6 mM
BSA (albumin bovine fraction V fatty acid free)	0.825 g	1.65 mg ml <sup>-1</sup>
Magnesium chloride	1.25 ml	2.5 mM
TE buffer (sterile)	50 ml	

NOTE: alternative commercial buffers may also be used.

Two negative controls are included, one comprising PCR cocktail only and the second containing 5 µl TE buffer.

The MCP-1 and MCP-2 reactions have the following profile: 1 cycle of denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 30 seconds and extension at 72°C for 1 minute; a final extension of 72°C for 5 minutes, and cooling to 4°C.

NOTE: the annealing temperature may be increased to 60 or 62°C to reduce nonspecific amplification when the assay is used to test fish tissues.

PCR results are assessed by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide. EHNV PCR control DNA (1/10 working stock) should give a result similar in intensity to the 10–3 band in both cases.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

#### Primer and probe sequences

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Marsh et al., 2002): Product amplicon size MCP-1 is 321 bp and product amplicon size MCP-2 is 625 bp			
MCP-1 Gene location: 266-586	M151: AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA M152: CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT	250 ng of each primer	35 cycles of 50°C for 30 sec NOTE: the annealing temperature may be increased to 60 or 62°C to reduce non-specific amplification when the assay is used to test fish tissues.
MCP-2 Gene location: 842-1466	M153: ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC M154: CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Not applicable.

#### 4.5. Amplicon sequencing

Amplicons generated using the MCP-1 and/or MCP-2 primers sets can be sequenced. Amplicons should be gel purified and sequenced using both the forward and reverse primer. Consensus sequence, generated after analysis of the quality of the sequence chromatograms, can then be compared to reference sequences, for example by BlastN search of the NCBI database.

---

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

Not applicable

#### 4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (immunoperoxidase stain)

Samples: formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections.

Technical procedure

The following protocol is intended for the qualitative demonstration of EHNV antigens in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (Reddacliff & Whittington, 1996). It assumes that antigens may have become cross linked and therefore includes a protease digestion step that may be omitted if unfixed samples are examined. A commercial kit (DAKO® LSAB K0679) with peroxidase-labelled streptavidin and a mixture of biotinylated anti-rabbit/anti-mouse/anti-goat immunoglobulins as link antibodies is used for staining. Other commercially supplied reagents are also used. For convenience these are also supplied by DAKO<sup>1</sup>. The primary affinity purified rabbit anti-EHNV antibody (Lot No. M708) is supplied freeze-dried by the WOA Reference Laboratory.

- i) Cut 5 µm sections and mount on SuperFrost® Plus G/Edge slides (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. No. HD 041300 72P3). Mark around the section with a diamond pencil to limit the spread of reagents.
- ii) Deparaffinise the section:  
Preheat slides in a 60°C incubator for 30 minutes.  
Place slides in a xylene bath and incubate for 5 minutes. Repeat once. Note that xylene replacements can be used without deleterious effects.  
Tap off excess liquid and place slides in absolute ethanol for 3 minutes. Repeat once.  
Tap off excess liquid and place slides in 95% ethanol for 3 minutes. Repeat once.  
Tap off excess liquid and place slides in distilled or deionised water for 30 seconds.
- iii) Expose antigens using a protease treatment. Flood slide with proteinase K (5–7 µg ml<sup>-1</sup>) and incubate for 20 minutes (ready-to-use solution, DakoCytomation Cat. No. S3020). Rinse slide by immersing three times in water. Place in a PBST bath for 5 minutes (PBS pH 7.2, 0.05% [v/v] Tween 20). Tap off the excess wash solution and carefully wipe around the section.
- iv) Perform the immunostaining reaction using the Universal DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Ensuring the tissue section is completely covered, add the following reagents to the slide. Avoid drying out.
- v) 3% hydrogen peroxide: cover the section and incubate for 5 minutes. Rinse gently with PBST and place in a fresh wash bath.
- vi) Primary antibody (affinity purified rabbit anti-EHNV antibody 1:/1500 Lot No. M708) and negative control reagent (non-immune rabbit-serum at a dilution of 1/1500) on a second slide. Cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- vii) Biotin-labelled secondary link antibody: ~~Link~~ cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- viii) Streptavidin peroxidase: cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.

---

1 Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, USA, Tel.: (+1-805) 566 6655, Fax: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Australia, Fax: (+61-2) 9316 4773; Visit <http://www.dakosytomahon.com> for links to other countries.

- 
- ix) Substrate–chromogen solution: cover the section and incubate for 5 minutes. Rinse slides gently with distilled water.
  - x) Counterstain by placing slides in a bath of DAKO® Mayer's Haematoxylin for 1 minute (Lillie's Modification, Cat. No. S3309). Rinse gently with distilled water. Immerse 10 times into a water bath. Place in distilled or deionised water for 2 minutes.
  - xi) Mount and cover-slip samples with an aqueous-based mounting medium (DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium Cat. No. S3025).

#### Interpretation of results

EHNH antigen appears as a brown stain in the areas surrounding degenerate and necrotic areas in parenchymal areas. There should be no staining with negative control ~~rabbit~~ serum on the same section.

Availability of test and reagents: antibody reagents and test protocols are available from the WOA Reference Laboratory.

#### 4.8. Bioassay

Not applicable.

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

An antigen ELISA for detection of EHNH and an EHNH antibody detection ELISA have been ~~described~~ reported (Whittington & Steiner, 1993). Indirect ELISA for detection of antibodies induced following exposure to EHNH has been described for rainbow trout and European perch (Whittington *et al.*, 1994; 1999; Whittington & Reddacliff, 1995). The same antibodies are suitable for immunohistochemistry on fixed tissues and for detection of ranavirus antigen in cell culture. Reagents and protocols are available from the reference laboratory. It should be noted that polyclonal antibodies used in all related methods (immunoperoxidase, antigen-capture ELISA and immunoelectron microscopy) cross-react with all known ranaviruses except Santee Cooper ranaviruses (Ahne *et al.*, 1998; Cinkova *et al.*, 2010; Hedrick *et al.*, 1992; Hyatt *et al.*, 2000).

#### 4.10. Other methods

~~Neutralising antibodies have not been detected in fish or mammals exposed to EHNH. Indirect ELISA for detection of antibodies induced following exposure to EHNH has been described for rainbow trout and European perch (Whittington *et al.*, 1994; 1999; Whittington & Reddacliff, 1995).~~ The sensitivity and specificity of these assays in relation to a standard test are not known and interpretation of results is difficult. Protocols and specific anti-immunoglobulin reagents required to conduct these tests are available from the reference laboratory.

#### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR is the most appropriate method of screening healthy fish populations for EHNH; however, the available methods are not specific for EHNH. Any real-time PCR positive samples should be tested by conventional PCR and sequence analysis to distinguish EHNH from other ranaviruses.

#### 6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

---

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status <sup>2</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link to an infected population. ~~Geographic-Hydrographical~~ proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with EHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) ~~EHNV-typical CPE in cell culture~~ ~~Positive result for EHNV based on virus isolation in cell cultures~~
- ii) Positive real-time or conventional PCR result
- iii) Positive EHNV antigen ELISA

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with EHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) EHNV-typical CPE in cell culture followed by identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon;
- ii) A positive result in tissue samples by real-time PCR and identification of EHNV by conventional PCR followed by sequence analysis of the amplicon.

~~Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.~~

## 6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with EHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Histopathology consistent with EHNV;
- ii) EHNV-typical CPE in cell cultures;
- iii) Positive real-time or conventional PCR result.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with EHNV is considered to be confirmed if, in addition to the criteria in Section 6.2.1, at least one of the following criteria is met:

- i) EHNV-typical CPE in cell culture followed by identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon;
- ii) A positive result in tissue samples by real-time PCR and identification of EHNV by conventional PCR followed by sequence analysis of the amplicon.

~~Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.~~

---

<sup>2</sup> For example transboundary commodities.

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with EHNV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. **(no data are currently available)**. This information can be used for the design of surveys for infection with EHNV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

#### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased fish (multiple species) from disease outbreaks and experimental infections	Pool of kidney, liver and spleen from individual fish	European perch ( <i>Perca fluviatilis</i> ), river blackfish ( <i>Gadopsis marmoratus</i> ), golden perch ( <i>Macquaria ambigua</i> ), trout cod ( <i>Maccullochella macquariensis</i> ), freshwater catfish ( <i>Tandanus tandanus</i> ), Macquarie perch ( <i>Macquaria australasica</i> ) rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	94.3%* (n = 105)	100% (n = 441)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Jaramillo <i>et al.</i> , (2012)
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased fish (multiple species) from disease outbreaks and experimental infections	Pool of kidney, liver and spleen from individual fish	European perch ( <i>Perca fluviatilis</i> ), river blackfish ( <i>Gadopsis marmoratus</i> ), golden perch ( <i>Macquaria ambigua</i> ), trout cod ( <i>Maccullochella macquariensis</i> ), freshwater catfish ( <i>Tandanus tandanus</i> ), Macquarie perch ( <i>Macquaria australasica</i> ) rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	95%* (n = 106)	100% (n = 80)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study;

PCR: = polymerase chain reaction. Note: these assays detect multiple ranaviruses in addition to EHNV that infect amphibian hosts. \*A positive result requires characterisation using sequencing to confirm that the result indicates the presence of EHNV.

#### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals: not available

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, qPCR: = real-time polymerase chain reaction.

## 7. References

AHNE W., BEARZOTTI M., BREMONT M. & ESSBAUER S. (1998). Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med. [B]*, **45**, 373–383.

---

AHNE W., OGAWA M. & SCHLOTFELDT H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 187–190.

AHNE W., SCHLOTFELDT H.J. & THOMSEN I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *J. Vet. Med. [B]*, **36**, 333–336.

ARIEL E. & BANG JENSEN B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **32**, 1017–1025.

Ariel E, Holopainen R, Olenen NJ & Tapiovaara H (2010). Comparative study of ranavirus isolates from cod (*Gadua morhua*) and turbot (*Psetta maxima*) with reference to other ranaviruses. *Archives of Virology* **155**, 1261-1271

ARIEL E., NICOLAISEN N., CHRISTOPHERSEN M.-B., HOLOPAINEN R., TAPIOVAARA H. & BANG JENSEN B. (2009). Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. *Aquaculture*, **294**, 159–164.

**BECKER J.A., GILLIGAN D., ASMUS M., TWEEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2019). Geographic distribution of Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in freshwater fish in south eastern Australia: lost opportunity for a notifiable pathogen to expand its geographic range. *Viruses*, **11**, 315 doi:10.3390/v11040315**

BECKER J.A., TWEEDIE A., GILLIGAN D., ASMUS M. & WHITTINGTON R. J. (2016). Susceptibility of Australian Redfin Perch *Perca fluviatilis* Experimentally Challenged with Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus (EHNV). *J. Aquat. Anim. Health*, **28**, 122–130.

BLOCH B. & LARSEN J.L. (1993). An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 235–240.

BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.

CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol.*, **147**, 447–470.

CHINCHAR G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family Iridoviridae. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–161.

CINKOVA K., RESCHOVA S., KULICH P. & VESELY T. (2010). Evaluation of a polyclonal antibody for the detection and identification of ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 191–198.

CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.

DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CALVERT I. (2002). Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, **150**, 451–452.

FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**, 151–158.

HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 203–209.

~~HOLOPAINEN R., HONKANEN J., JENSEN B.B., ARIEL E. & TAPIOVAARA H. (2011). Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *J. Virol. Methods*, **171**, 225–233.~~

HOLOPAINEN R., OHLEMAYER S., SCHÜTZE H., BERGMANN S.M. & TAPIOVAARA H. (2009). Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 81–91.

HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. & COUPAR B.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*, **145**, 301–331.

- 
- HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A. & LEE J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.
- JARAMILLO D., TWEEDIE A., BECKER J.A., HYATT A., CRAMERI S. & WHITTINGTON R.J. (2012). A validated quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of ranaviruses (Family Iridoviridae) in fish tissue and cell cultures, using EHNV as a model. *Aquaculture*, **356–357**, 186–192.
- LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.
- LANGDON J.S. & HUMPHREY J.D. (1987). Epizootic Hematopoietic Necrosis a New Viral Disease in Redfin Perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J. Fish Dis.*, **10**, 289–298.
- LANGDON J.S., HUMPHREY J.D. & WILLIAMS L.M. (1988). Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *J. Fish Dis.*, **11**, 93–96.
- LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D. & WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, **9**, 263–268.
- MAO J., THAM T.N., GENTRY G.A., AUBERTIN A. & CHINCHAR V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, **216**, 431–436.
- MAO J.H., HEDRICK R.P. & CHINCHAR V.G. (1997). Molecular characterisation, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, **229**, 212–220.
- MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, **16**, 137–151.
- PALLISTER J., GOULD A., HARRISON D., HYATT A., JANCOVICH J. & HEINE H. (2007). Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *J. Fish Dis.*, **30**, 427–438.
- POZET F., MORAND M., MOUSSA A., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 35–42.
- REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoeitic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, **115**, 103–115.
- RIMMER A.E., BECKER J.A., TWEEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2012). Validation of high throughput methods for tissue disruption and nucleic acid extraction for ranaviruses (family Iridoviridae). *Aquaculture*, **338–341**, 23–28.
- SPEARE R. & SMITH J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 51–57.
- STILWELL N.K., WHITTINGTON R.J., HICK P.M., BECKER J.A., ARIEL E., VAN BEURDEN S., VENDRAMIN N., OLESEN N.J. & WALTZEK T.B. (2018). Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR for the detection of ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **128**, 105–116.
- WHITTINGTON R.J., BECKER J.A. & DENNIS M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *J. Fish Dis.*, **33**, 95–122.
- WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.
- WHITTINGTON R.J., PHILBEY A., REDDACLIFF G.L. & MACGOWN A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, **17**, 205–218.
-

---

WHITTINGTON R.J. & REDDAKLIF G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.*, **72**, 421–424.

WHITTINGTON R.J., REDDAKLIF L.A., MARSH I., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 125–130.

WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, **43**, 205–220.

WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. & QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, **118**, 253–262.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & ROBINSON A.J. (1998). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 1–9.

\*  
\* \*

**NB:** There is a WOA Reference Laboratory for infection with epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)  
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on infection with EHNV.

The WOA Reference Laboratory can supply purified EHNV DNA, heat killed EHNV antigen  
and polyclonal antibodies against EHNV together with technical methods.

A fee is charged for the reagents to cover the costs of operating the laboratory.

**NB:** FIRST ADOPTED IN 1995 AS EPIZOOTIC HAEMATOPUIETIC NECROSIS; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

CHAPTER 2.3.9.

INFECTION WITH SPRING  
VIRAEMIA OF CARP VIRUS

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with SVCV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are:

Family	Scientific name	Common name
Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Bream
	<i>Aristichthys nobilis</i>	Bighead carp
	<i>Carassius auratus</i>	Goldfish
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Grass carp
	<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp (all varieties and subspecies)
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Golden shiner
	<i>Pimephales promelas</i>	Flathead minnow
	<i>Percocypris pingi</i>	Jinsha bassbarbel carp
	<i>Rutilus kutum</i>	Caspian white fish
	<i>Rutilus rutilus</i>	Roach
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Wels catfish

[...]

CHAPTER 2.4.2.

INFECTION WITH *BONAMIA EXITIOSA*

---

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Bonamia exitiosa* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: Argentinean flat oyster (*Ostrea puelchana*), Ariake cupped oyster (*Magallana (syn. Crassostrea) ariakensis*), Australian mud oyster (*Ostrea angasi*), Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), crested oyster (*Ostrea equestris*), eastern oyster (*Crassostrea virginica*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), and Olympia oyster (*Ostrea lurida*) and Suminoe oyster (*Magallana (syn. Crassostrea) ariakensis*).

2.2. 12. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *B. exitiosa* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: dwarf oyster (*Ostrea stentina*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Pacific cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] gigas*) and Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*).

[...]

---

CHAPTER 2.4.3.

INFECTION WITH *BONAMIA OSTREAE*

---

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Bonamia ostreae* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: Ariake cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), and Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), and Suminoe oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *B. ostreae* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: Argentinean flat oyster (*Ostrea puelchana*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: beadlet anemone (*Actina equina*), brittle star (*Ophiothrix fragilis*), European sea squirt (*Asciidiella aspersa*), grouped zooplankton and Pacific cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] gigas*).

[...]

---

CHAPTER 2.4.4.

INFECTION WITH *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Oyster species: *Ostrea edulis* (Grizel *et al.*, 1974); and mussel species: *Mytilus* species including *M. edulis* (Le Roux *et al.*, 2001) and *M. galloprovincialis* (López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005; Robledo *et al.*, 1995a; Villalba *et al.*, 1993b).

Infection with *M. refringens* was demonstrated in the oyster *Ostrea stentina*, the clam species *Solen marginatus* (López-Flores *et al.*, 2008a) and *Chamelea gallina* (López-Flores *et al.*, 2008b) and the mussel *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.*, 2010).

Other *Ostrea* species including *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi*, and *O. denselamellosa* were found to be infected with *Marteilia* sp. when deployed in an infected area (Berthe *et al.*, 2004; Martin, 1993). However, in these cases, the parasite identification was not done at the molecular level.

In addition, different stages, including mature stages, of parasites looking like *M. refringens*, were observed by histology in cockles (*Cerastoderma edule*), clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*), and oysters (*Crassostrea virginica*) among other bivalve species (Berthe *et al.*, 2004; López-Flores *et al.*, 2008b). In all these cases, parasite identification is uncertain.

Lastly, the copepod *Paracartia grani* was shown to be susceptible to *M. refringens* and this species could participate in the transmission of the parasites between bivalves (see 2.3.1)

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Marteilia refringens* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) are: blue mussel (*Mytilus edulis*), dwarf oyster (*Ostrea stentina*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), European razor clam (*Solen marginatus*), golden mussel (*Xenostrobus securis*), Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and striped venus clam (*Chamelea gallina*).

Additionally, a copepod species (*Paracartia grani*) has been found to meet the criteria for listing as susceptible to infection with *Marteilia refringens* and is considered an intermediate host.

2.2.2. Susceptible stages of the host Species with incomplete evidence for susceptibility

Juveniles and older life stages are known to be susceptible (Grizel, 1985).

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *M. refringens* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code are: Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), a copepod (*Paracartia latisetosa*) and Japanese flat oyster (*Ostrea denselamellosa*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*), grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*), Pacific cupped oyster (*Magallana* [syn. *Crassostrea*] *gigas*) and zooplankton (*Acartia discaudata*, *Centropages typicus*, *Euterpina acutifrons*, unidentified *Oithona* sp., *Penilia avirostris*).

[...]

## SECTION 2.2.

# DISEASES OF CRUSTACEANS

## CHAPTER 2.2.0.

# GENERAL INFORMATION

## A. SAMPLING

### 1. Assessing the health status of the epidemiological unit

#### 1.1. Sample material to be used for tests

Sample material and the number of samples to be collected depend on the specific disease or pathogen, the size of animals and the objective of testing (i.e. surveillance of apparently healthy animals, presumptive diagnosis of clinically affected animals or confirmatory diagnosis of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis of overt disease, detection of subclinical infection in apparently healthy animals or sampling for targeted surveillance to demonstrate freedom from infection with a specified pathogen). See the individual disease chapters in this *Aquatic Manual* for specific details of sample requirements.

#### 1.2. Specifications according to crustacean populations

For details of animals to sample for a specific listed disease, see the relevant disease chapter in the *Aquatic Manual*. The design of a surveillance system for demonstrating disease-free status for a country, zone or compartment should be in accordance with the recommendations of the WOA *Aquatic Code* Chapter 1.4. *Aquatic animal disease surveillance*.

Animals to be sampled are selected as follows:

- i) Susceptible species should be sampled proportionately or following risk-based criteria for targeted selection of lots epidemiological units or populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. replacement with stocks of unknown disease status).
- ii) If more than one water source is used for production, animals from all water sources should be included in the sample.
- iii) For the study of presumptively diseased crustaceans select those animals that are moribund, discoloured, displaying abnormal behaviour, or otherwise abnormal. If weak, abnormally behaving discoloured or freshly dead (not decomposed) animals are present, such animals should be selected. If such animals are not present, animals should be selected in such a way that all epidemiological units of the farm or waterbody are proportionately represented in the sample.
- iv) When sampling is aimed at assessing disease occurrence (e.g. estimation of disease prevalence), the preferred selection method is probability sampling.

#### 1.3. Specifications according to clinical status

In clinical disease episodes, carefully selected quality specimens with representative lesions should be obtained from live or moribund crustaceans. Collection of dead specimens during disease outbreaks should be avoided when possible, but recently dead samples may be suitable for some diagnostic assays provided they are not decomposed. When cultured or wild

---

crustacean stocks are presenting clinical signs of an active disease that are consistent with, or suggestive of, any one of the WOAH-listed crustacean diseases, care should be taken to ensure that the samples collected are preserved appropriately for the anticipated diagnostic tests (see sample preservation section for recommended methods). In situations other than when clinical disease episodes are investigated, for the WOAH-listed diseases it is highly recommended that the scheduling of sampling be planned (i.e. by farm schedule, season, etc.) so that the particular life-stage(s) are sampled at a time when the pathogen of concern is most likely to be detected. Disease-specific recommendations are provided in Section 3 *Sample selection, sample collection, transportation and handling* of the individual chapters.

~~Recently dead crustaceans may be suitable (depending on their condition) for certain diagnostic assays such as nucleic acid detection techniques.~~

#### 1.4. Specifications according to crustacean size

See the individual disease chapters in this *Aquatic Manual* for specific details of sample requirements.

### 2. General processing of samples

#### 2.1. Macroscopic examination

See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

#### 2.2. Virological examination

~~Virological examination of crustaceans is not routinely used for listed diseases. *Macrobrachium rosenbergii* has been isolated in insect cell lines, but it is not a recommended method.~~

##### 2.2.1. Transportation and antibiotic treatment of samples

~~Culture systems for crustacean viruses are not available; antibiotic treatment of samples is not required. For transportation of samples see Section 3 of disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. Not applicable.~~

##### 2.2.2. Virus isolation

~~For processing of tissues see Section 3 of disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. Not applicable.~~

##### 2.2.3. Treatment to neutralise enzootic viruses

Not applicable.

#### 2.3. Bacteriological examination

~~Bacteriological examination of crustaceans is not routinely used for listed diseases, but it may be used for the strains of *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*<sub>AHPND</sub>) that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and for can be isolated on standard bacteriological media. *Hepatobacter penaei*, the causative agent of necrotising hepatopancreatitis (NHP) has not been cultured and, because of its very small size, bacteriological examination may be limited to Gram staining.~~ See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual* for identification methods.

#### 2.4. Parasitic examination

Not applicable for currently listed diseases.

#### 2.5. Fungal and other protists examination

See Chapter 2.2.2 *Infection with *Aphanomyces astaci* (Crayfish plague)*.

---

## B. MATERIALS AND BIOLOGICAL PRODUCTS REQUIRED FOR THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CRUSTACEAN PATHOGENS

### 1. Crustacean viruses

#### 1.1. Crustacean cell lines

Not applicable. There are currently no confirmed or documented crustacean cell lines.

#### 1.2. Culture media

Not applicable.

#### 1.3. Virus positive controls and antigen preparation

##### 1.3.1. Virus nomenclature

In general, the virus nomenclature used in the disease-specific chapters follows the most recent taxonomy for viruses as given in the Report of the Committee on Taxonomy of Viruses (see: [ICTV \[ictvonline.org\]](http://ictvonline.org) for latest information). Also provided in the disease-specific chapters are the disease and virus names that are in common use by the shrimp/prawn farming industries, as well as the more common synonyms that have been used or are in current use.

##### 1.3.2. Virus production for experimental purposes

As no cell lines (crustacean, arthropod, or vertebrate) are known that can be used to produce crustacean viruses, infection of known susceptible host species (which are free of infection by-with the pathogenic agent in question) is the preferred method for virus production for experimental purposes.

##### 1.3.3. Virus preservation and storage

Infectivity of all of the WOA-listed crustacean viruses can be preserved by freezing infected whole crustaceans or infected target tissues at  $-20^{\circ}\text{C}$  for short-term storage, or at  $-80^{\circ}\text{C}$  or lower for long-term storage.

### 2. Crustacean bacteria

#### 2.1. Culture media

See Chapter 2.2.1. *Acute hepatopancreatic necrosis disease* for details.

#### 2.2. Storage of cultures

Lyophilisation or storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  is recommended for long-term storage of bacterial cultures.

### 3. Crustacean parasites

#### 3.1. Culture media

Not applicable for currently listed diseases.

#### 3.2. Storage of cultures

Not applicable for currently listed diseases.

### 4. Crustacean fungi and protists

---

#### 4.1. Culture media

See chapter 2.2.2. [Infection with \*Aphanomyces astaci\* \(crayfish plague\)](#)

#### 4.2. Storage of cultures

See Chapter 2.2.2.

#### 5. Techniques

The available diagnostic methods that may be selected for diagnosis of the WOA-listed crustacean diseases or detection of their aetiological agents are based on:

- i) Gross and clinical signs.
- ii) Direct bright-field, phase-contrast or dark-field microscopy with whole stained or unstained tissue wet-mounts, tissue squashes, and impression smears; and wet-mounts of faecal strands.
- iii) Histology of fixed specimens.
- iv) Bioassays of suspect or subclinical carriers using a highly susceptible host (life stage or species) as the indicator for the presence of the pathogen.
- v) Antibody-based tests for pathogen detection using specific antisera, polyclonal antibodies (PABs) or monoclonal antibodies (MAbs).
- vi) Molecular methods (including sequencing):

DNA probes or RNA probes for *in-situ* hybridisation (ISH) assays with histological sections of fixed tissues;

Conventional and real-time PCR/RT-PCR and LAMP for direct assay with fresh tissue samples or with extracted DNA or RNA.

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. If the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, larger crustaceans should be processed and tested individually. However, for eggs, larvae and postlarvae pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50 to 150 postlarvae depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material to run a diagnostic assay.

#### 5.1. Antibody-based tests

See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

#### 5.2. Direct microscopy

Samples for direct microscopic examination should be examined as soon as possible after collection. Use live specimens whenever possible, or use fresh, chilled, or fixed specimens when live specimens are not practical. If an adequate field laboratory is available, it should be used to process and examine samples near the site of collection.

#### 5.3. Histological techniques

Only live or moribund specimens with clinical signs should be sampled for histology. Collect crustaceans by whatever means are available with a minimum of handling stress. Hold animals in a container appropriate for maintaining suitable water quality and supply adequate aeration to the container if the crustaceans are to be held for a short period of time before actual fixation.

##### 5.3.1. Fixation

---

A general rule is that a minimum of ten volumes of fixative should be used for one volume of tissue sample (i.e. a 10 g sample of crustacean would require 100 ml of fixative).

i) Davidson's AFA (alcohol, formalin, acetic acid) fixative

Davidson's AFA fixative is recommended for most histological applications. The fixative is rapid, reduces autolytic changes in decapod crustaceans (i.e. especially in crustaceans in tropical and subtropical regions), and its acidic content decalcifies the cuticle. The formulation for Davidson's AFA is (for 1 litre):

330 ml 95% ethyl alcohol  
220 ml 100% freshly made formalin (a saturated 37–39% aqueous solution of formaldehyde gas)  
115 ml glacial acetic acid  
335 ml tap water (for marine crustaceans, seawater may be substituted)  
Store the fixative in glass or plastic bottles with secure caps at room temperature.

ii) Fixation procedures with Davidson's AFA

*For larvae and postlarvae that are too small to be easily injected with fixative using a tuberculin syringe:* Using a fine mesh screen or a Pasteur pipette, select and collect specimens. Immerse crustaceans selected for sampling directly in the fixative. Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

*For juveniles that are too small to be injected:* Select and collect specimens. Use a needle or fine-pointed forceps to incise the cuticle and immediately immerse crustaceans selected for sampling directly into the fixative. Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

*For large juveniles and adults:* to ensure proper fixation, kill the crustacean using a humane method, then immediately inject fixative (use 5–10% volume:weight). Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

The hepatopancreas (HP) should be injected first and at two or more sites, with a volume of fixative sufficient to change the HP to a white-to-orange colour (when Davidson's AFA is used); then inject fixative into adjacent regions of the cephalothorax, into the anterior abdominal region, and into the posterior abdominal region.

The fixative should be divided between the different regions, with the cephalothoracic region, specifically the HP, receiving a larger share than the abdominal region.

Immediately following injection, slit the cuticle with dissecting scissors, from the sixth abdominal segment to the base of the rostrum, being particularly careful not to cut deeply into the underlying tissue. The incision in the cephalothoracic region should be just lateral to the dorsal midline, while that in the abdominal region should be approximately mid-lateral.

*For crustaceans larger than ~12 g:* After injection of fixative, the body should then be transversely bisected, at least once, just posterior to the abdomen/cephalothorax junction, and (optional) again mid-abdominally.

*For very large crustaceans (e.g. lobsters, crabs, adult penaeids, adult Macrobrachium rosenbergii, some species and life stages of crabs, crayfish, etc.):* The organs of interest may be excised after injection of fixative. Completion of fixation of these tissue samples is then handled as outlined previously.

Following injection, incisions and bisection/trisection, or excision of key organs, immerse the specimen in the fixative (use 10:1 fixative:tissue ratio).

Allow fixation to proceed at room temperature for 24–72 hours depending on the size of crustacean being preserved. Longer fixation times in Davidson's AFA may be used to thoroughly decalcify the shell of crabs, lobsters, crayfish, etc.

Following fixation, the specimens should be transferred to 70% ethyl alcohol, where they can be stored for an indefinite period.

iii) Transport and shipment of preserved samples

As large volumes of alcohol should not be mailed or shipped, the following methods are recommended: Remove the specimens from the 70% ethyl alcohol. For larvae, postlarvae, or small juveniles, use leak-proof, screw-cap plastic vials if available; if glass vials must be used, pack to prevent breakage. For larger specimens, wrap samples with white paper towels to completely cover (do not use raw or processed cotton). Place towel-wrapped specimens in a sealable plastic bag and saturate with 70% ethyl alcohol. Insert the label and seal the bag. Place the bag within a second sealable bag.

---

Multiple small sealable bags can again be placed within a sturdy, crush-proof appropriately labelled container for shipment (for details see *Aquatic Code* Chapter 5.10 *Measures concerning international transport of aquatic animal pathogens and pathological material*).

#### 5.4. Transmission or scanning electron microscopy

Electron microscopy (EM – transmission or scanning) is a valuable research tool for the study of disease in crustaceans. However, EM methods are not routinely used for diagnosis of the diseases listed by WOA. H.

#### 5.5. Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis

Molecular techniques, including the use of nucleic acid probes for *in-situ* hybridisation, conventional PCR and real-time PCR, have been developed for the identification of many pathogens of aquatic animals. Real-time PCR methods, in general, have high sensitivity and specificity and, following adequate validation, can be used for direct detection of viral nucleic acids in samples prepared-extracted from crustacean tissue. The Molecular techniques can be used in direct surveillance of apparently healthy populations, if they have a high level of diagnostic sensitivity, as well as in the diagnosis of clinically affected animals.

When using PCR as a diagnostic method, the design of primers and probe, the use of positive and negative controls, as well as validation of the PCR method chosen are important. Real-time PCR is a powerful technique particularly for analysing relatively high numbers of samples (e.g. for surveillance) via high-throughput testing. Several nucleic acid probe and PCR protocols are included in this version of the *Aquatic Manual* as screening, diagnostic or confirmatory methods for crustaceans and can be undertaken as the standard method. Following real-time PCR-positive results, where possible, conventional PCR with sequencing of PCR products should be used for confirmation of pathogen identity.

As with all PCR protocols, optimisation may be necessary depending on the reagents, equipment and the plasticware used. PCR is prone to false-positive and false-negative results. False-positive results (negative samples giving a positive reaction) may arise from either product carryover from positive samples or, more commonly, from cross-contamination by PCR products from previous tests. False-negative results (positive samples giving a negative result) may lead to unwanted transmission of pathogens and biosecurity failure.

Each diagnostic sample should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots, and Both aliquots must produce positive results for a sample to be deemed positive. In instances where a sample produces one positive and one negative result, these are deemed indeterminate and should be retested. In addition, the following controls should be run with each assay: negative extraction control (e.g. a tissue [or equivalent sample that is under test]) sample from a known uninfected animal; positive control (preferably, one that can be distinguished from the pathogen genomic sequence [e.g. an artificial plasmid], thus allowing detection of any cross-contamination leading to a false positive result); no template control (all reagents with water replacing the template); internal positive control (internal housekeeping gene). All controls should produce their expected results in order for the diagnostic test result to be valid.

To minimise the risk of contamination, aerosol-preventing barrier pipette tips should be used for all sample preparation and PCR preparation steps. Additionally, all PCRs should be prepared in a clean area that is separate from the area where the nucleic acid extraction, amplifications and gel electrophoresis are performed. Do not share equipment (e.g. laboratory coats and consumables) between areas and, where possible, restrict access between areas. Contaminating PCR products can be carried on equipment, clothes, shoes, pens/marker pens and paper (e.g. workbooks). Also, ensure all work-tops and air-flow cabinets/hoods used for the extractions and PCR set-up are regularly cleaned and decontaminated. To ensure sample integrity, always store the samples (e.g. in a freezer or refrigerator) in a location away-separate from the molecular biology laboratory and reagents

##### 5.5.1. Sample preparation and types

Samples should be prepared to preserve the nucleic acid of the pathogen and should be handled and packaged with the greatest care to minimise the potential for cross-contamination among the samples or target degradation before the assay can be performed. Samples selected for nucleic acid-based or antibody-based diagnostic tests should be handled and packaged (in new plastic sample bags or bottles) with care to minimise the potential for cross-contamination among the sample set taken from different (wild or farmed) stocks, tanks, ponds, farms, etc. A water-resistant label, with the appropriate data filled out, should be placed within each package or container for each sample set.

---

Some suitable methods for preservation and transport of samples taken for molecular ~~or antibody-based~~ tests are:

- i) *Live specimens*: these may be processed in the field or shipped to the diagnostic laboratory for testing.
- ii) *Haemolymph*: this tissue is the preferred sample for certain molecular and antibody-based diagnostic tests (see disease-specific chapters). Samples may be collected by needle and syringe through cardiac puncture, from the haemocoel (i.e. the ventral sinus in penaeids), or from a severed appendage, and immediately transferred to a tube that is half full with ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol or suitable nucleic acid preservative.
- iii) *Iced or chilled specimens*: these are specimens that can be transported to the laboratory for testing within 24 hours. Pack samples in sample bags surrounded by an adequate quantity of wet ice ~~or freezer bricks~~ around the bagged samples in an insulated box and ship to the laboratory.
- iv) *Frozen ~~whole~~ specimens*: select live specimens according to the criteria listed in disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. ~~In situations where it is not possible to get the specimens to the laboratory alive, they may be~~ quick ~~freeze-frozen~~ in the field using crushed dry-ice or ~~freeze-frozen~~ in the field laboratories using a mechanical freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  or lower temperature. Prepare and insert the label into the container with the samples, pack samples with an adequate quantity of dry-ice in an insulated box, and ship to the laboratory.
- v) *Alcohol-preserved samples*: in regions where the storage and shipment of frozen samples is problematic, ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol may be used to preserve, store, and transport certain types of samples for molecular tests. Alcohol-preserved samples are generally not suitable for antibody-based tests. Whole crustaceans (any life stage provided the specimen is no larger than 2–3 g), excised tissues (i.e. pleopods) from large crustaceans, or haemolymph may be preserved in ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol, and then packed for shipment according to the methods described in Section 5.3.1, paragraph iii (see chapter 5.10 of the *Aquatic Code* for additional details on the international transport of such samples).
- vi) *Fixed tissues for in-situ hybridisation*: For this purpose, classic methods for preservation of the tissues are adequate. **Neutral-buffered formalin is usually a good choice. Fixation for over 24–48 hours should be avoided; samples should be transferred to ethanol following formalin treatment.**

#### 5.5.2. Preservation of RNA and DNA in tissues

For routine diagnostic testing by PCR or RT-PCR, samples must be prepared to preserve the pathogen's nucleic acid. For most purposes, preservation of samples in ~~analytical grade ethanol alcohol~~ (80–90%) is the preferred method for subsequent molecular tests. Samples preserved in this way can be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 month, at  $25^{\circ}\text{C}$  for 1 week or indefinitely at  $-20^{\circ}\text{C}$  or below. In addition, other products (e.g. nucleic acid preservatives, various lysis buffers, etc.) are commercially available for the same purpose.

#### 5.5.3. Nucleic acid extraction

To isolate nucleic acids from tissues preserved in ethanol or nucleic acid preservative, simply remove the tissue from the fixative or preservative and treat it as though it was just harvested. Most fresh and preserved or fixed tissues can be homogenised (e.g. with a mortar and pestle or in bead-beating tubes) directly in the lysis or extraction buffer provided with commercially available DNA and RNA extraction kits. Commercial kits should be validated or undergo equivalence testing with current validated extraction procedures prior to routine use.

#### 5.5.4. Preparation of slides for *in-situ* hybridisation

For *in-situ* hybridisation, fixed tissues that have been transferred to ~~70%~~ **80% analytical grade** ethanol are embedded in paraffin according to standard histological methods. Sections are cut at a thickness of 5  $\mu\text{m}$  and placed on aminoalkylsilane-coated slides, which are then baked overnight in an oven at  $40^{\circ}\text{C}$ . The sections are de-waxed by immersing in xylene for 10 minutes. This step is repeated once and then the solvent is eliminated by immersion in two successive absolute ethanol baths for 10 minutes each. The sections are then rehydrated by immersion in an ethanol series. The protocol may require a step of membrane permeabilisation enabling access to the target DNA. For this purpose, sections are treated with proteinase K ( $100\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ ) in TE buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. For *in-situ* hybridisation tests (see individual chapters for details), it is essential that both a known positive and a known negative slide be stained to eliminate false positive results due to non-specific staining/stain dropout, and false negative results due to errors in the staining protocol (Qadiri *et al.*, 2019; Valverde *et al.*, 2017). For further details see disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

---

## 6. Additional information to be collected

Sample information should include the collector's name, organisation, date, time, and description of the geographical location. The geographical origin of samples may be described as the name or location of the sampling site or its geographical co-ordinates. There should also be records that provide information to allow trace-backs on the sample movement from the sample site to the storage facility or laboratory and within those facilities.

A history of the specimens should also be collected and should include species, age, weight, details of clinical signs including behavioural changes, as well as observations concerning any gross pathology which has been observed.

Information on the preservation method, storage location, and date and time of storage at each storage locker or freezer along with information on the storage temperature (continuously monitored is preferable) should be collected. This information should be tracked with a unique sample code for all samples. For laboratories, the date of receipt, storage location information, date of analysis, analysis notes, and report date should be maintained for all uniquely coded samples. These data will greatly facilitate the tracking of sample problems and provide assurance that the samples were properly handled.

## 4. KEY REFERENCES FOR FURTHER READING

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

JOHNSON P.T. (1980). Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. A Model for the Decapoda. Prager, New York, USA, 440 pp.

LIGHTNER D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 pp.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J, NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invert. Pathol.*, **110**, 174–183.

LOTZ J.M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 405–413.

MOODY N.J.G. & CRANE M.ST.J. (2016). Validation of diagnostic tests in the OIE manual for aquatic animals. In: Proc. 3rd OIE Global Conference on Aquatic Animal Health – “Riding the Wave of the Future”, Ho Chi Minh City, Vietnam, 20–22 January 2015, pp.119–126.

QADIRI S.S.N., SOO-JIN KIM S.-J., KRISHNAN R., KIM J.-O., KOLE S., KIM W.-S. & OH M.-J. (2019). Localization and tissue tropism of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in experimentally infected juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: An *in situ* hybridization and immunohistochemical study. *Aquaculture*, **505**, 242–252.

THITAMADEE S, PRACHUMWAT A., SRISALA J., JAROENLAK P., SALACHAN P.V., SRITUNYALUCKSANA K, FLEGEL T.W. & ITSATHITPHAISARN O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, **452**, 69–87.

VALVERDE E.J., BORREGO J.J., SARASQUETE M.C., ORTIZ-DELGADO J.B. & CASTRO D. (2017). Target organs for lymphocystis disease virus replication in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Vet. Res.*, **48**, 21. doi 10.1186/s13567-017-0428-3.

WALKER P.J. & MOHAN C.V. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Rev. Aquaculture*, **1**, 125–154.

\*  
\* \*

**NB:** FIRST ADOPTED IN 2000; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012.

## CHAPTER 2.2.2.

# INFECTION WITH *APHANOMYCES ASTACI* (CRAYFISH PLAGUE)

---

### 1. Scope

Infection with *Aphanomyces astaci* means infection with the pathogenic agent *A. astaci*, Phylum Oomycota. The disease is commonly known as crayfish plague.

### 2. Disease information

#### 2.1. Agent factors

##### 2.1.1. Aetiological agent

*Aphanomyces astaci* is a water mould. The Oomycetida or Oomycota, are considered protists and are classified with diatoms and brown algae in a group called the Stramenopiles or Chromista.

Five groups (A–E) of *A. astaci* have been described based on random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1994; Kozubikova *et al.*, 2011). Additional geno- or haplotypes are still being detected using molecular methods (Di Domenico *et al.*, 2021). Group A (the so called *Astacus* strains) comprises strains isolated from several European crayfish species. These strains are thought to have been in Europe for a long period of time. Group B (*Pacifastacus* strains I) includes isolates from several European crayfish species and from the invasive *Pacifastacus leniusculus* in Europe as well as Lake Tahoe, USA. Imported to Europe, *P. leniusculus* probably introduced this genotype of *A. astaci* and infected the native European crayfish. Group C (*Pacifastacus* strains II) consists of a strain isolated from *P. leniusculus* from Pitt Lake, Canada. Another strain (Pc), isolated from *Procambarus clarkii* in Spain, sits in group D (*Procambarus* strains). This strain shows temperature/growth curves with higher optimum temperatures compared with groups A and B (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 1995). *Aphanomyces astaci* strains that have been present in Europe for many years (group A strains) appear to be less pathogenic than strains introduced with crayfish imports from North America since the 1960s. North American host species spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) has been shown to be a carrier of Group E (Kozubíková *et al.*, 2011).

##### 2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

*Aphanomyces astaci* is poorly resistant against desiccation and does not survive long in decomposing hosts. Any treatment of the crayfish (freezing, cooking, drying) will affect the survival of the pathogen (Oidtmann *et al.*, 2002). Isolation from processed samples is not possible, however they may be suitable for molecular methods used for pathogen detection.

##### 2.1.3. Survival and stability outside the host

Outside the host *Aphanomyces astaci* is found as zoospores that remain motile for up to 3 days and form cysts that can survive for 2 weeks in distilled water. As *A. astaci* can go through three cycles of encystment and zoospore emergence, the maximum life span outside of a host could be several weeks. Spores remained viable in a spore suspension in clean water kept at 2°C for 2 months (Unestam, 1966). Survival time is probably shorter in natural waters.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

#### 2.2. Host factors

---

### 2.2.1. Susceptible host species

The recommendations in this chapter apply to all species of crayfish in all three crayfish families (Cambaridae, Astacidae and Parastacidae).

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with *A. astaci* in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

All stages of crayfish species native to Europe, including the noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender-clawed or Turkish crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor are highly susceptible (e.g. Holdich *et al.*, 2009). Australian species of crayfish are also highly susceptible. North American crayfish such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Faxonius* spp. are infected by *A. astaci*, but under normal conditions the infection does not cause clinical disease or death. All North American crayfish species investigated to date have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (reviewed by Svoboda *et al.* 2017) and it is therefore currently assumed that this is the case for any other North American species.

The only other crustacean known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

[Under study]

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

The host species susceptible to infection with *A. astaci* fall largely into two categories: those highly susceptible to infection with that development of clinical disease and mortalities, and those that are infected without associated but do not display any significant clinical disease or mortalities. All life stages are considered susceptible to infection with *A. astaci*.

Species that develop clinical disease and mortalities include the noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender-clawed or Turkish crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor (e.g. Holdich *et al.*, 2009). Australian species of freshwater crayfish are also considered vulnerable to clinical disease and mortalities.

Species that can be infected but do not normally develop clinical disease include North American crayfish species such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Faxonius* spp. All North American crayfish species that have been investigated have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (reviewed by Svoboda *et al.* 2017).

Highly susceptible species: Clinical disease outbreaks caused by infection with *A. astaci* are generally known as 'crayfish plague' outbreaks. In such outbreaks, moribund and dead crayfish of a range of sizes (and therefore ages) can be found.

The only non-crayfish crustacean species known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The tissue that becomes initially infected is the exoskeleton cuticle. Soft cuticle, as is found on the ventral abdomen and around joints, is preferentially affected. In the highly susceptible European crayfish species, which are prone to development of clinical disease, the pathogen often manages to penetrate the basal lamina located underneath the epidermis cell layer. From there, *A. astaci* spreads throughout the body primarily by invading connective tissue and haemal sinuses; however, all tissues may be affected.

In North American crayfish species, infection is usually restricted to the cuticle. Based on PCR results, the tailfan (consisting of uropods and telson) and soft abdominal cuticle appear to be frequently infected (Oidtman *et al.*, 2006; Vralstad *et al.*, 2011).

---

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

North American crayfish species act mostly as reservoirs carriers of the infection without showing clinical signs. However, some strains of *A. astaci*, especially from group A, show lowered virulence, thus enabling ~~normally highly susceptible~~ European crayfish to act as reservoirs carriers as well (see review by Svoboda *et al.*, 2017).

~~Colonisation of habitats, initially by North American crayfish species carrying *A. astaci* occupied by highly susceptible is likely to result in an epizootic if crayfish species that are prone to expression of clinical disease are present by North American crayfish species carrying *A. astaci* is likely to result in an epizootic among the highly susceptible animals.~~

### 2.2.6. Vectors

~~Transportation of finfish may facilitate the spread of *A. astaci* through the presence of spores in the transport water or co-transport of infected crayfish specimens (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (e.g. nets, boots, clothing, traps) (Alderman *et al.*, 1987). None known.~~

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity, and prevalence

When the infection first reaches a naïve population of ~~highly susceptible~~ crayfish species that are prone to clinical disease, high levels of mortality are usually observed within a short space of time, ~~so that in and in~~ areas with high crayfish densities the bottoms of lakes, rivers and streams are covered with dead and dying crayfish. A band of mortality will spread quickly from the initial outbreak site downstream, whereas upstream spread is slower. Lower water temperatures are associated with ~~lower a lower rate of~~ mortalities and a greater range of clinical signs in affected animals (Alderman *et al.*, 1987). Observations from Finland suggest that at low water temperatures, noble crayfish (*Astacus astacus*) can be infected for several months without ~~the development of any~~ noticeable mortalities (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2013).

On rare occasions, single specimens of ~~the highly susceptible~~ species that are prone to clinical disease have been found after a wave of infection with *A. astaci* has gone through a river or lake. This is most likely to be due to lack of exposure of these animals during an outbreak (animals may have been present in a tributary of a river or lake or in a part of the affected river/lake that was not reached by spores, or crayfish may have stayed in burrows during the epizootic). However, low virulent strains of *A. astaci* have been described to persist in a water way, kept alive by a weak infection in the remnant population (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011). Although remnant populations of susceptible crayfish species remain in many European watersheds, the dense populations that existed 150 years ago are now heavily diminished (Souty-Grosset *et al.*, 2006; Holdich *et al.*, 2009). Populations of susceptible crayfish may re-establish, but once population density and geographical distribution is sufficient for susceptible animals to come into contact with spores, new outbreaks of infection with *A. astaci* and large-scale mortalities will occur.

~~In the highly susceptible~~ European crayfish species, exposure to *A. astaci* spores usually leads to infection and eventually to death. Prevalence of infection within a population in the early stage of an outbreak may be low (few animals in a river population may be affected). However, the pathogen ~~is~~ amplified in affected animals and subsequently released into the water; usually leading to 100% mortality in a contiguous population. The rate of spread from initially affected animals depends on several factors, one being water temperature. Therefore, the time from first introduction of the pathogen into a population to noticeable crayfish mortalities can vary greatly and may range from a few weeks to months. Prevalence of infection will gradually increase over this time and usually reach 100%. Data from a noble crayfish population in Finland that experienced an acute mortality event due to infection with *A. astaci* in 2001 suggest that in sparse noble crayfish populations, spread of disease throughout the host population may take several years (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

#### *Susceptible species*

Gross clinical signs are variable and depend on challenge severity and water temperatures. The first sign of an epizootic may be the appearance of crayfish during daylight (crayfish are normally nocturnal), some of which may show loss of co-ordination, falling onto their backs and remaining unable to right themselves. Occasionally, the infected animals can be seen trying to scratch or pinch themselves.

---

Often, however, the first sign of an outbreak may be the presence of large numbers of dead crayfish in a river or lake (Alderman *et al.*, 1987).

Infection with *A. astaci* may cause mass mortality of crayfish. However, investigation of mortality event should consider other causes such as environmental pollution (e.g. insecticides such as cypermethrin have been associated with initial misdiagnoses).

#### *North American crayfish species*

Infected North American crayfish may be subclinical carriers. Controlled exposure to a highly virulent strain has resulted in mortality in juvenile stages of *Pacifastacus leniusculus* as well as behavioural alterations in adults (Thomas *et al.*, 2020).

### 2.3.3 Gross pathology

#### Susceptible Species prone to clinical disease

Depending on a range of factors, the foci of infection in crayfish may be seen by the naked eye or may not be discernible despite careful examination. Infection foci are best viewed under a low power stereo microscope and are recognisable by localised whitening of the muscle beneath the cuticle. In some cases, a brown colouration of cuticle and muscle may occur, or hyphae may be visible in infected cuticles in the form of fine brown (melanised) tracks in the cuticle. Sites for examination include the intersternal soft ventral cuticle of the abdomen and tail, the cuticle of the perianal region, the cuticle between the carapace and abdomen, the joints of the pereopods (walking legs), particularly the proximal joint, eyestalks and finally the gills.

#### *North American crayfish species*

Infected North American crayfish ~~do not usually show signs of disease~~ can sometimes show melanised spots in their soft cuticle, for example, the soft abdominal cuticle and joints. These melanisations can be caused by mechanical injuries or infections with other water moulds and are non-specific. However, populations with high levels of infection can show abnormally high levels of cuticular damage in individual animals, such as missing legs and claws due to deteriorated joints.

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

~~The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, as may occur during movements of finfish, or 3) through colonisation of habitats by invasive North American crayfish species.~~

~~The main route of spread of *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms. Subsequent spread occurs through expanding populations of invasive North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Holdich *et al.*, 2009).~~

Transmission from crayfish to crayfish occurs through the release of zoospores from an infected animal and attachment of the zoospores to naïve crayfish. The life cycle of *A. astaci* is simple with vegetative hyphae invading and ramifying through host tissues, eventually producing extramatrical sporangia that release amoeboid primary spores. These initially encyst, but then release a biflagellate zoospore (secondary zoospore). Biflagellate zoospores swim in the water column and, on encountering a susceptible host, attach and germinate to produce invasive vegetative hyphae. The zoospores of *A. astaci* swim actively in the water column and have been demonstrated to show positive chemotaxis towards crayfish (Cerenius & Söderhäll, 1984). Zoospores are capable of repeated encystment and re-emergence, extending the period of their infectivity (Soderhall & Cerenius 1999). Growth and sporulation capacity is strain-and temperature-dependent (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, or 3) through colonisation of non-native habitats by invasive North American crayfish species.

The main route of spread of *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms. Subsequent spread occurred through expanding populations of invasive North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Holdich *et al.*, 2009).

---

Transportation of finfish may facilitate the spread of *A. astaci* through the presence of spores in the transport water or co-transport of infected crayfish specimens (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (e.g. nets, boots, clothing, traps) (Alderman *et al.*, 1987).

### 2.3.5. Environmental factors

Under laboratory conditions, the preferred temperature range at which the *A. astaci* mycelium grows varies slightly depending on the strain. In a study, which compared several *A. astaci* strains that had been isolated from a variety of crayfish species, mycelial growth was observed between 4 and 29.5°C, with the strain isolated from *Procambarus clarkii* growing better at higher temperatures compared to the other strains. Sporulation efficiency was similarly high for all strains tested between 4 and 20°C, but it was clearly reduced for the non-*P. clarkii* strains at 25°C and absent at 27°C. In contrast, sporulation still occurred in the *P. clarkii* strain at 27°C. The proportion of motile zoospores (out of all zoospores observed in a zoospore suspension) was almost 100% at temperatures ranging from 4–18°C, reduced to about 60% at 20°C and about 20% at 25°C in all but the *P. clarkii* strain. In the *P. clarkii* strain, 80% of the zoospores were still motile at 25°C, but no motile spores were found at 27°C (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 1995).

Field observations show that outbreaks of infection with *A. astaci* occur over a wide temperature range, and at least in the temperature range 4–20°C. The rate of spread within a population depends on several factors, including water temperature. In a temperature range between 4 and 16°C, the speed of an epizootic is enhanced by higher water temperatures.

In buffered, redistilled water, sporulation occurs between pH 5 and 8, with the optimal range being pH 5–7. The optimal pH range for swimming of zoospores appears to be pH 6.0–7.5, with a maximum range between pH 4.5 and 9.0 (Unestam, 1966).

Zoospore emergence is influenced by the presence of certain salts in the water. CaCl<sub>2</sub> stimulates zoospore emergence from primary cysts, whereas MgCl<sub>2</sub> has an inhibitory effect. In general, zoospore emergence is triggered by transferring the vegetative mycelium into a medium where nutrients are absent or low in concentration (Cerenius *et al.*, 1988).

### 2.3.6. Geographical distribution

In Europe the reports of large mortalities of crayfish go back to 1860. The reservoir of the original infections in the 19th century was never established. *Faxonius (Orconectes)* spp. were not known to have been introduced into Europe until the 1890s, but the post-1960s extensions are largely linked to more recent introductions of North American crayfish for farming (Alderman, 1996; Holdich *et al.* 2009). *Pacifastacus leniusculus* and *Procambarus clarkii* are now widely naturalised in many parts of Europe.

In recent years, crayfish plague has been reported in Asia and also in North- and South America (see e.g. references in Di Domenico *et al.* 2021). The distribution of *A. astaci* in North America is likely to be much wider than reported.

~~Any geographical area where North American crayfish species were introduced must be considered as potentially infected if not proven otherwise. Lack of clinical disease in these carrier species may hamper the reliability in reporting the infection. For the highly susceptible species, See WOAHS WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level. However, even high mortalities can go unnoticed in wild populations.~~

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

No vaccines are available.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No treatments are currently known that can successfully treat the highly susceptible crayfish species, once infected.

### 2.4.3. Immunostimulation

No immunostimulants are currently known that can successfully protect the highly susceptible crayfish species against infection and consequent disease due to *A. astaci* infection.

---

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

A few studies suggest that there might be differences in resistance between populations of highly susceptible species crayfish species that are prone to clinical disease (reviewed by Martin-Torrijos *et al.*, 2017; Svoboda *et al.*, 2017). ~~The fact that North American crayfish generally do not develop clinical disease suggests that selection for resistance may be possible and laboratory studies using attenuated strains of *A. astaci* might be successful. However, there are currently no published data from such studies.~~

#### 2.4.5. Inactivation methods

*Aphanomyces astaci*, both in culture and in infected crayfish, is inactivated by a short exposure to temperatures of 60°C or to temperatures of –20°C (or below) for 48 hours (or more) (Oidtmann *et al.*, 2002). Sodium hypochlorite at 100 ppm, free chlorine and iodophors at 100 ppm available iodine, are effective for disinfection of contaminated equipment. Equipment must be cleaned prior to disinfection since organic matter decreases the effectiveness of disinfectants (Alderman & Polglase, 1985). Thorough drying of equipment (>24 hours) is also effective as *A. astaci* is not resistant to desiccation (Rennerfelt, 1936).

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

No information available.

#### 2.4.7. General husbandry

If a ~~crayfish farm for highly susceptible~~ crayfish species that are prone to clinical disease is being planned, it should be carefully investigated whether North American crayfish species are in the vicinity of the planned site or present upstream. If North American crayfish are present, there is a high likelihood that susceptible farmed crayfish will eventually become infected.

In an endemic area where ~~the highly susceptible species~~ prone to expression of clinical disease are being farmed, the following biosecurity recommendations should be followed to avoid an introduction of *A. astaci* onto the site:

1. General biosecurity should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when entering the site; investigation of mortalities if they occur; introduction of live animals (crayfish, finfish) only from sources known to be free from infection with *A. astaci*).
2. Movements of potentially infected live or dead crayfish, potentially contaminated water, equipment or any other item that might carry the pathogen from an infected to an uninfected site holding susceptible species should be prevented.
3. If transfers of finfish or crayfish are being planned, these should not come from streams or other waters that harbour potentially infected crayfish (either susceptible crayfish populations that are going through a current outbreak of infection with *A. astaci* or North American ~~earlier~~ crayfish species).
4. North American crayfish should not be brought onto the site.
5. Finfish obtained from unknown freshwater sources or from sources, where North American crayfish may be present or a current outbreak of infection with *A. astaci* may be taking place, must not be used as bait or feed for crayfish, unless they have been subject to a temperature treatment to kill *A. astaci* (see Section 2.4.5. *Inactivation methods*).
6. Any equipment that is brought onto site should be disinfected.

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

For a suspected outbreak of infection with *A. astaci* in a population of ~~highly susceptible~~ crayfish species that are prone to clinical disease, sampled crayfish should ideally consist of: a) live crayfish showing signs of disease, and b) live, apparently healthy crayfish. Freshly dead crayfish may also be suitable, although this will depend on their condition.

---

Live crayfish should be transported using insulated containers equipped with small holes to allow aeration. The temperature in the container should not exceed 16°C.

Crayfish should be transported in a moist atmosphere, for example using moistened wood shavings/wood wool, newspaper, or grass/hay. Unless transport water is sufficiently oxygenated, live crayfish should not be transported in water, as they may suffocate.

The time between sampling of live animals and delivery to the investigating laboratory should not exceed 24 hours.

Should only dead animals be found at the site of a suspected outbreak, freshly dead animals should be selected for diagnosis. Dead animals can either be: a) transported chilled (if they appear to have died only very recently), or, b) placed in non-methylated ethanol (minimum concentration 70%; see 3.5. *Preservation of samples for submission*), or c) placed in freezer at –20°C to avoid further decay and transported frozen.

When testing any population outside an acute mortality event for the presence of crayfish plague, as many individuals as possible should be inspected visually for signs of cuticular damage. Crayfish that have melanized spots or missing limbs should be selected in the first place for further analysis.

### 3.2. Selection of organs or tissues

In highly susceptible species that are prone to clinical disease, the tissue recommended for sampling is the soft abdominal cuticle, which can be found on the ventral side of the abdomen. Any other soft part of the exoskeleton can be included as well. If any melanised spots or whitened areas are detected, these should be included in the sampling. From diseased animals, samples should be aseptically collected from the soft abdominal cuticle. For identification of carriers, samples should be aseptically collected from soft abdominal cuticle, and telson and uropods, separately.

In the North American crayfish species, sampling of soft abdominal cuticle, uropods and telson are recommended. Any other soft part of the exoskeleton can be included as well. If any melanized spots are detected, these should be included in the sampling.

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Autolysed material is not suitable for analysis.

### 3.4. Non-lethal sampling

A non-destructive sampling method that detects *A. astaci* DNA in the microbial biofilm associated with the cuticle of individual crayfish through vigorous scrubbing has been described (Pavic *et al.*, 2020), and could be considered in case of testing vulnerable populations.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

### 3.5. Preservation of samples for submission

The use of non-preserved crayfish is preferred, as described above. If transport of recently dead or moribund crayfish cannot be arranged, crayfish may be frozen or fixed in ethanol (minimum 70%). However, fixation may reduce test sensitivity. The crayfish:ethanol ratio should ideally be 1:10 (1 part crayfish, 10 parts ethanol).

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0

#### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation depends strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Isolation is best attempted from crayfish with clinical signs delivered alive (see Section 3.1.). Fresh specimens should be kept chilled and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection.

#### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

---

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information (diseases of crustaceans)*.

### 3.5.3. Samples for histopathology

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 2.2 of Chapter 2.2.0 *General information (diseases of crustaceans)*.

### 3.5.4. Samples for other tests

Sensitive molecular methods can be used to detect *A. astaci* DNA directly from water samples (Strand *et al.* 2011, 2012). These methods require validation for diagnostic use.

## 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger animals should be processed and tested individually. Small life stages such as PL, can be pooled to obtain the minimum amount of material for molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
++ =	Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
+ =	Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts						+	+	NA				
Histopathology						+	+	NA				
Cell-Culture						+	+	NA				
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods <sup>3</sup>												
Other methods <sup>3</sup>												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available. PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification;

Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

#### 4.1. Wet mounts

Small pieces of soft cuticle excised from the regions mentioned above (Section 2.3.3 *Gross pathology*) and examined under a compound microscope using low-to-medium power will confirm the presence of aseptate fungal-like hyphae 7–9 µm wide. The hyphae can usually be found pervading the whole thickness of the cuticle, forming a three-dimensional network of hyphae in heavily affected areas of the cuticle. The presence of host haemocytes and possibly some melanisation closely associated with and encapsulating the hyphae give good presumptive evidence that the hyphae represent a pathogen rather than a secondary opportunist invader. In some cases, examination of the surface of such mounted cuticles will demonstrate the presence of characteristic *A. astaci* sporangia with clusters of encysted primary spores ~~(see Section 4.3 Culture for isolation).~~

#### 4.2. Histopathology

Unless the selection of tissue for fixation has been well chosen, *A. astaci* hyphae can be difficult to find in stained preparations. A histological staining technique, such as the Grocott silver stain counterstained with conventional haematoxylin and eosin, can be used. However, such material does not prove that any hyphae observed are those of *A. astaci*, especially when the material comes from animals already dead by sampling.

See also Section 4.1 *Wet mounts*.

#### 4.3. Culture for isolation

Isolation is not recommended as a routine diagnostic method (Alderman & Polglase, 1986; Cerenius *et al.*, 1987; Viljamaa-Dirks, 2006). Test sensitivity and specificity of the cultivation method can be very variable depending on the experience of the examiner, but in general will be lower than the PCR. Isolation of *A. astaci* by culture from apparently healthy crayfish is challenging and molecular methods are recommended. A detailed description of this test is available from the Reference Laboratory<sup>1</sup>.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate. Shrimp tissues may be used as negative controls.

Live crayfish can be killed using chloroform, electric current or by mechanical destroying the nerve cords. If live or moribund animals are not available, only recently dead animals should be used for DNA extraction. The soft abdominal cuticle is the preferred sample tissue for DNA extraction. Any superficial contamination should first be removed by thoroughly wiping the soft abdominal cuticle with wet (using autoclaved H<sub>2</sub>O) clean disposable swabs. The soft abdominal cuticle is then excised and 30–50 mg ground using a pestle and mortar.

Several PCR assays have been developed with varying levels of sensitivity and specificity. Two assays are described here. Both assays target the ITS (internal transcribed spacer) region of the nuclear ribosomal gene cluster within the *A. astaci* genome.

##### *Extraction of nucleic acids*

~~Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.~~

##### 4.4.1. Real-time PCR

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling conditions
--------------------------	----------------------	---------------	--------------------

---

<sup>1</sup> <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>

Method 1*: Vralstad <i>et al.</i> , 2009, Strand, 2013; GenBank Accession No.: AM947024			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> & <i>A. fennicus</i> /ITS	Fwd: AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT Rev: CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A Probe: 6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-C-MGBNFQ	500 nM <u>500 nM</u> 200 nM	50 cycles of: 95°C/15 sec and 60°C/30 sec
Alternative method 2: Strand <i>et al.</i> to be published; GenBank Accession No.: AM947024			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> /ITS	Fwd: TAT-CCA-CGT-GAA-TGT-ATT-CTT-TAT Rev: GCT-AAG-TTT-ATC-AGT-ATG-TTA-TTT-A Probe: FAM-AAG-AAC-ATC-CCA-GCA-C-MGBNFQ	500 nM <u>500 nM</u> 200 nM	50 cycles of: 95°C/15 sec and 60°C/30 sec

\*These ITS-based methods have been found to give positive results for the species *Aphanomyces fennicus* (Viljamaa-Dirks & Heinikainen 2019).

The absolute limit of detection of method 1 was reported as approximately 5 PCR forming units (= target template copies), which is equivalent to less than one *A. astaci* genome (Vralstad *et al.*, 2009). Another study reported consistent detection down to 50 fg DNA using this assay (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Analytical test specificity has been investigated (Tuffs & Oidtmann, 2011; Vralstad *et al.*, 2009) and no cross-reaction was observed in these studies. However, a novel species, *Aphanomyces fennicus*, isolated from noble crayfish was reported in 2019 (Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2019) that gave a positive reaction in this test at the same level as *A. astaci*. Due to this problem in specificity, the assay has been modified according to the alternative method 2 (Strand *et al.*, manuscript in preparation):

Owing to the repeated discovery of new *Aphanomyces* strains, sequencing is required to determine the species of *Aphanomyces*. In the case of the real-time PCR assay, this requires separate amplification of a PCR product using primers ITS-1 and ITS-4 (see Section 4.5 *Amplicon sequencing*).

#### 4.4.2. Conventional PCR

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling conditions
Method 1*: Oidtmann <i>et al.</i> , 2006; GenBank Accession No.: AY310499; <del>Product-amplicon</del> size: 569 bp			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> & <i>A. fennicus</i> /ITS	Fwd: GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT Rev: CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-	500 nM <u>500 n</u>	40 cycles of: 1 min/96°C, 1 min/59°C and 1 min/72°C

\*This ITS-based method has been found to give positive results for the species *Aphanomyces fennicus* (Viljamaa-Dirks & Heinikainen 2019).

Confirmation of the identity of the PCR product by sequencing is required as a novel species, *A. fennicus*, isolated from noble crayfish was reported in 2019 (Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2019) that gave a positive reaction in this assay.

The assay consistently detects down to 500 fg of genomic target DNA or the equivalent amount of ten zoospores submitted to the PCR reaction (Tuffs & Oidtmann, 2011).

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Several genotype-specific molecular methods have been developed that, instead of requiring a pure growth as sample material like the RAPD-PCR assay, can be used to analyse crayfish tissue directly (Di Domenico *et al.*, 2021; Grandjean *et al.*, 2014; Makkonen *et al.*, 2018; Minardi *et al.*, 2018; 2019). Detection of a known genotype group combined with a positive result by a recommended conventional or real-time PCR can be used as a confirmative test in geographical areas where crayfish plague is known to be present. However, the current knowledge of the genotype variation is mostly limited

---

to a few original host species and new genotypes or subtypes are expected to be found. Thus, the suitability of these methods is limited for initial excluding diagnosis or as confirmative tests in geographical areas not known to be infected.

PCR targeting mitochondrial DNA with *A. astaci* genotype specific primers have been shown to detect the known genotypes of *A. astaci*, but these assays may also provide positive results for some other oomycete genera (Casabella-Herrero *et al.*, 2021).

#### 4.5. Amplicon sequencing

~~and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.~~

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

Not available.

#### 4.7. Immunohistochemistry

Not available

#### 4.8. Bioassay

No longer used for diagnostic purposes (see Cerenius *et al.*, 1988).

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Not available.

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

The recommended method for surveillance is real-time PCR, the modified assay by Strand *et al.* (manuscript in preparation).

### 6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. ~~It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case.~~ If a laboratory Competent Authority does not have the capacity-capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

#### 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>2</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographic proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

---

<sup>2</sup> For example transboundary commodities.

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* shall be suspected if at least the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time PCR
- ii) Positive result by conventional PCR

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time PCR and positive result by conventional PCR followed by amplicon sequencing

## 6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Visual observation of hyphae indicative of *A. astaci* in wet mounts
- iii) Observation of hyphae indicative of *A. astaci* in stained histological sections
- iv) Culture and isolation of the pathogen
- v) Positive result by real-time PCR
- vi) Positive result by conventional PCR

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* is confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time PCR and positive result by conventional PCR and amplicon sequencing

## 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *Aphanomyces astaci* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (~~none~~ no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with *Aphanomyces astaci*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe ( <i>n</i> )	DSp ( <i>n</i> )	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study.

### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study.

## 7. References

- ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 603–632.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquacult. Fish. Manage.*, **16**, 203–205.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.
- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.
- CASABELLA-HERRERO G., MARTÍNEZ-RÍOS M., VILJAMAA-DIRKS S., MARTÍN-TORRIJOS L. & DIÉGUEZ-URIBEONDO J. (2021). *Aphanomyces astaci* mtDNA: insights into the pathogen's differentiation and its genetic diversity from other closely related oomycetes. *Fungal Biol.*, **125**, 316–325. doi: 10.1016/j.funbio.2020.11.010. Epub 2020 Dec 2.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropodparasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K. & FULLER M.S. (1987). *Aphanomyces astaci* and *Aphanomyces* spp. In: Zoosporic fungi in teaching and research, Fuller M.S. & Jaworski A., eds. South-Eastern Publishing Corp., Athens, Georgia, USA. pp 64–65.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M. & AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshwater Crayfish*, **7**, 131–144.
- DI DOMENICO M., CURINI V., CAPRIOLI R., GIANANTE C., MRUGAŁA A., MOJŽIŠOVÁ M., CAMMA C. & PETRUSEK A. (2021). Real-Time PCR assays for rapid identification of common *Aphanomyces astaci* genotypes. *Front. Ecol. Evol.*, **9**, art 597585 doi:10.3389/fevo.2021.597585.
- DIEGUEZ-URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.
- GRANDJEAN F., VRÅLSTAD T., DIÉGUEZ-URIBEONDO J., JELIĆ M., MANGOMBI J., DELAUNAY C., FILIPOVÁ L., REZINCIUC S., KOZUBÍKOVÁ-BALCAROVA E., GYONNET D., VILJAMAA-DIRKS S. & PETRUSEK A. (2014). Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet. Microbiol.*, **170**, 317–324.
- HOLDICH D.M., REYNOLDS J.D., SOUTY-GROSSET C. & SIBLEY P.J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, **394–395**, 1–46.
- HUANG T.S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–10.
- KOZUBÍKOVÁ E., VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S. & PETRUSEK A. (2011). Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci*. *J. Invertebr. Pathol.*, **108**, 214–216.
- MAKKONEN J., JUSSILA J., PANTELEIT J., KELLER N.S., SCHRIMPF A., THEISSINGER K., KORTET R., MARTÍN-TORRIJOS L., SANDOVAL-SIERRA J.V., DIÉGUEZ-URIBEONDO J. & KOKKO H. (2018). MtDNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration. *Parasitology*, **145**, 1210–1218. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000227>.
- MARTIN-TORRIJOS L., CAMPOS LACH M., POU ROVIRA Q. & DIÉGUEZ-URIBEONDO J. (2017). Resistance to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Oomycota) in the endangered freshwater crayfish species, *Austroptamobius pallipes*. *PLoS ONE*, **12** (7), e0181226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181226>

- 
- MINARDI D., STUDHOLME D.J., OIDTMANN B., PRETTO T. & VAN DER GIEZEN M. (2019). Improved method for genotyping the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on mitochondrial DNA. *Parasitology*, 146, 1022–1029, doi:[10.1017/S0031182019000283](https://doi.org/10.1017/S0031182019000283)
- MINARDI D., STUDHOLME D.J., VAN DER GIEZEN M., PRETTO T. & OIDTMANN B. (2018). New genotyping method for the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on whole genome data. *J. Invertebr. Pathol.*, **156**, 6–13.
- OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.
- OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.
- PAVIC D., ČANKOVIĆ M., PETRIĆ I., MAKKONEN J., HUDINA S., MAGUIRE I., VLADUŠIĆA T., ŠVER L., HRAŠČANA R., ORLIĆ K., DRAGIČEVIĆ P. & BIELEN A. (2020) Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *J. Invertebr. Pathol.*, **169**, 107274. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107274>
- RENNERFELT E. (1936). Untersuchungen über die Entwicklung und Biologie des Krebspestpilzes *Aphanomyces astaci* Schikora. Report of the Institute of Freshwater Research (Drottningholm, Sweden), **10**, 1–21.
- SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFNER P. (eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.
- STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.
- STRAND D.A., JUSSILA J., VILJAMAA-DIRKS S., KOKKO H., MAKKONEN J., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H. & VRÅLSTAD T. (2012). Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Vet. Microbiol.*, **160**, 99–107.
- STRAND D.A. (2013) Environmental DNA monitoring of the alien crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater systems – Sporulation dynamics, alternative hosts and improved management tools. *Dissertation book, University of Oslo Faculty of Mathematics and Natural Sciences Department of Biosciences, Oslo*, ISSN 1501-7710, 73 p.
- SVOBODA J., MRUGAŁA A., KOZUBÍKOVÁ-BALCAROVÁ E. & PETRUSEK A. (2017). Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *J. Fish Dis.*, **40**, 127–140. <https://doi.org/10.1111/jfd.12472>
- SODERHALL K. & CERENIUS L. (1999) The crayfish plague fungus: history and recent advances. *Freshwater Crayfish*, **12**, 11–34.
- THOMAS J.R., ROBINSON C.V., MRUGAŁA A., ELLISON A.R., MATTHEWS E., GRIFFITHS S.W., CONSUEGRA S. & CABLE J. (2020). Crayfish plague affects juvenile survival and adult behaviour of invasive signal crayfish. *Parasitology*, **1–9**, <https://doi.org/10.1017/S0031182020000165>
- TUFFS S & OIDTMANN B (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **153**, 345–353.
- UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiol. Plant.*, **19**, 1110–1119.
- ~~UNESTAM T. & SODERHALL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshwater Crayfish*, **3**, 321–331.~~
- VILJAMAA-DIRKS S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshwater Crayfish*, **15**, 376–382.
- VILJAMAA-DIRKS S. & HEINIKAINEN S. (2019) A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *J. Fish Dis.*, **42**, 413–422. <https://doi.org/10.1111/jfd.12955>
- VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **31**, 182–188.
-

---

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., TORSSONEN H., PURSIAINEN M., MATTILA J. & PELKONEN S. (2013). Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland. *Dis. Aquat. Org.*, **103**, 199–208.

VRALSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRALSTAD T., KNUITSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

~~WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.~~

\*  
\* \*

**NB:** There is a WOAHP Reference Laboratory for infection with *Aphanomyces astaci* (crayfish plague)  
(please consult the WOAHP web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOAHP Reference Laboratories for any further information on  
infection with *Aphanomyces astaci* (crayfish plague)

**NB:** FIRST ADOPTED IN 1995; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.



CHAPTER 2.2.6.

INFECTION WITH  
*MACROBRACHIUM ROSENBERGII* NODAVIRUS (WHITE TAIL  
DISEASE)

---

1. Scope

Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus means infection with the pathogenic agent *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) in the Family *Nodaviridae*. The disease is commonly known as white tail disease (WTD).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Two viruses are associated with WTD, namely MrNV (primary) and extra small virus (XSV) (associate) (Qian *et al.*, 2003; Romestand & Bonami, 2003). MrNV is a necessary cause of WTD in prawns, however, the role of XSV in pathogenicity remains unclear.

MrNV belongs in the family *Nodaviridae* (Bonami *et al.*, 2005). While the physico-chemical properties of MrNV are consistent with those of other members of the *Nodaviridae*, it differs structurally and genetically from other nodaviruses within the two recognised genera, *Alphanodavirus* and *Betanodavirus* (Ho *et al.*, 2017, 2018; Naveenkumar *et al.*, 2013). Consequently, a third genus, *Gammanodavirus*, has been proposed for nodaviruses that infect crustaceans, including MrNV and *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) (Naveenkumar *et al.*, 2013).

XSV is the first sequenced satellite virus in aquatic animals and it is also the first record of a satellite-nodavirus association (Bonami *et al.*, 2005). XSV has been classified by the ICTV as *Macrobrachium* satellite virus 1 of the family *Sarothroviridae*.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Both viral pathogens (MrNV and XSV) are stable in processed or stored samples stored at –20 or –80°C. Storing the samples at –80°C is recommended for long-time storage and maintenance of pathogen virulence (Sahul Hameed & Bonami, 2012). The infected samples should be processed at low temperature to maintain the stability of the viruses. Viral inoculum prepared from infected prawn stored at –20°C caused 100% mortality in postlarvae (PL) of *M. rosenbergii* by immersion challenge (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a). Ravi & Sahul Hameed (2016) found that MrNV in tissue suspensions was inactivated after exposure to 50°C for at least 5 min.

2.1.3. Survival and stability outside the host

Survival outside the host is not known.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with MrNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*).

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with MrNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: white leg shrimp (*Penaeus vannamei*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results (but not active infection) have been reported in the following species:

Family	Scientific name	Common name
Aeshnidae	<i>Aeshna</i> sp.	dragonfly
Artemiidae	<i>Artemia</i> sp.	brine shrimps
Belostomatidae	<i>Belostoma</i> sp.	giant water bug
Dytiscidae	<i>Cybister</i> sp.	beetle
Notonectidae	<i>Notonecta</i> sp.	backswimmer
Palaemonidae	<i>Macrobrachium rude</i>	hairy river prawn
	<i>Macrobrachium malcolmsonii</i>	monsoon river prawn
Parastacidae	<i>Cherax quadricarinatus</i>	red claw crayfish
Penaeidae	<i>Penaeus japonicus</i>	kuruma prawn
	<i>Penaeus indicus</i>	Indian white prawn
	<i>Penaeus monodon</i>	giant tiger prawn

### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Experimental pathogenicity studies revealed that larvae, PL and early juveniles of *M. rosenbergii* are susceptible to MrNV/XSV, whereas adults are resistant (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

No mortality was observed either in naturally or experimentally (MrNV/XSV) infected subadult and adult prawns. Experimental studies confirmed vertical transmission from infected broodstock to PL (Sudhakaran *et al.*, 2007a).

### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

MrNV and XSV have been demonstrated in gill tissue, head muscle, heart, abdominal muscle, ovaries, pleopods and tail muscle, but not the hepatopancreas or eyestalk (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003).

### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

One study has indicated the possibility that marine shrimp act as a reservoir for MrNV and XSV and that these viruses maintain virulence in the shrimp tissue system (Sudhakaran *et al.*, 2006).

### 2.2.6. Vectors

Aquatic insects such as giant water bug (*Belostoma* sp.), dragonfly (*Aeshna* sp.), beetle (*Cybister* sp.) and backswimmer (*Notonecta* sp.) may act as mechanical carriers for MrNV/XSV and are a potential transmission risk to cultivated *Macrobrachium rosenbergii* (Sudhakaran *et al.*, 2008). It is recommended to remove these insects from freshwater prawn culture systems, especially at larval-rearing centres. Sudhakaran *et al.* (2008) demonstrated RT-PCR positives from insects, and infected C6/36 insect cell line with tissue homogenates from the insects. Viral replication was confirmed through EM and RT-PCR, but transmission from insects to naïve shrimp was not demonstrated.

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Larvae, PL and juveniles of *M. rosenbergii* are susceptible to infection with MrNV, which often causes high mortalities in these life stages. Mortality may reach a maximum in about 5 or 6 days after the appearance of the first clinical signs. Very few PL with infection with MrNV survive beyond 15 days in an outbreak, but PL that survive may grow to market size.

---

Adults are resistant to infection with *MrNV*, but act as carriers (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a). Prevalence is variable from 10% to 100% in hatchery, nursery and grow-out systems (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; 2004b).

#### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Infected PL become opaque and develop a whitish appearance, particularly in the abdominal region. The whitish discoloration appears first in the second or third abdominal segment and gradually diffuses both anteriorly and posteriorly. In severe cases, degeneration of telson and uropods may occur. Floating exuviae (moult) in the tanks appear abnormal and resemble 'mica flakes' (Arcier *et al.*, 1999). The infected PL show progressive weakening of their feeding and swimming ability (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

#### 2.3.3. Gross pathology

Infection with *MrNV* is indicated by the whitish coloration of abdominal muscle.

#### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission is vertical by trans-ovum and horizontal by the waterborne route (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2007a).

#### 2.3.5. Environmental factors

Not available.

#### 2.3.6. Geographical distribution

The disease was first reported in the French West Indies (Arcier *et al.*, 1999), later in Asia-Pacific (Murwantoko *et al.*, 2016; Owens *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2003; Saedi *et al.*, 2012; Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2008; Yoganandhan *et al.*, 2006).

See WOA-H-WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

### 2.4. Biosecurity and disease control strategies

Preventive measures, such as screening of broodstock and PL, and good management practices may help to prevent infection with *MrNV* in culture systems. As the life cycle of *M. rosenbergii* is completed under controlled conditions, specific pathogen-free (SPF) broodstock and PL can be produced (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

#### 2.4.1. Vaccination

Not available

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No known chemotherapeutic agents reported to treat *MrNV*-infected prawn.

#### 2.4.3. Immunostimulation

The immunomodulatory effect of recombinant capsid protein and recombinant RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) protein of *MrNV* has been studied and the protection of viral challenged post-larvae from *MrNV* infection has been demonstrated (Farook *et al.*, 2014; NaveenKumar *et al.*, 2021).

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

None reported

#### 2.4.5. Inactivation methods

---

A viral suspension treated with heat at 65°C for 2 hours destroyed infectivity of *MrNV* and *XSV* in challenge experiments (Qian *et al.*, 2003). The viral inoculum exposed to UV irradiation for a period of 5 minutes and more was totally inactivated and failed to cause mortality in PL of prawn (Ravi & Sahul Hameed, 2016).

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Routine disinfection procedures followed for crustacean viral disease control are suggested.

#### 2.4.7. General husbandry

*MrNV* is transmitted both horizontally and vertically in culture systems (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2007a). Good husbandry practices, such as proper disinfection of tanks and water may help to prevent infection. It is recommended to remove insects from freshwater prawn culture systems, especially at larval-rearing centres. Specific pathogen-free (SPF) broodstock and PL can be obtained from disease free populations or by RT-PCR screening and selection of negative broodstock (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

PLs are most suitable for detection of *MrNV*. PL showing clinical signs of disease can be sampled preferentially. Adults and juveniles can be sampled for *MrNV* however prevalence in these lifestages may be lower (see Section 2.3.1).

#### 3.2. Selection of organs or tissues

The tissues most affected in moribund PLs/early juveniles are striated muscles of the abdomen, cephalothorax and tail. The whole PL body is preferred for detection of *MrNV* (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). All organs of adult *M. rosenbergii* except eyestalks and the hepatopancreas, are best for screening the viruses by RT-PCR.

#### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Eyestalks and the hepatopancreas of adult prawns are not suitable (Sri Widada *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

#### 3.4. Non-lethal sampling

Pleopods (swimming legs) are a convenient source of RNA for non-destructive screening of *MrNV* in adult prawn (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

#### 3.5. Preservation of samples for submission

Infected larvae or PL with prominent signs of whitish muscle in the abdominal region are collected from disease outbreak areas. Samples are washed in sterile saline, transferred to sterile tubes, and transported to the laboratory. For general guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

##### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

Moribund or frozen PL samples can be used for isolation of viral pathogens using cell lines (C6/36 mosquito cell line (Sudhakaran *et al.*, 2007b)).

##### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

---

Infected samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  or samples preserved in 80% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol should be used for RT-PCR for detection of MrNV (Sri Widada *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Yoganandhan *et al.*, 2005).

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Tissue samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation should be fixed immediately after collection in neutral-buffered formalin or modified Davidson's fixative (Sri Widada *et al.*, 2003). The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1. Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 5.3. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

### 3.5.4. Samples for other tests

Not applicable

## 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore larger animals should be processed and tested individually. Small life stages such as PL, can be pooled to obtain the minimum amount of material for virus isolation or molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by life stage.

**Ratings against purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating against the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, cost, timeliness, and sample throughput. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Most suitable methods – desirable performance and operational characteristics;
++ =	Suitable method(s) acceptable performance and operational characteristics under most circumstances;
+ =	Less suitable methods – performance or operational characteristics may significantly limit application;
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

**Level of validation.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology						++	++					
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	+++	+++	+++	2				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	2
<i>In-situ</i> hybridisation						++	++	1		++	++	1
Bioassay												
LAMP	++	++	++	1	++	++	++	1				
Ab-ELISA												
Ag-ELISA					++	++	++	1				
Lateral flow assay					++	++	++	2				
Other methods <sup>3</sup>												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

#### 4.1. Wet mounts

None to date

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

The most affected tissue in infected PL is striated muscle of the cephalothorax, abdomen and tail. Histological features include the presence of acute Zenker's necrosis of striated muscles, characterised by severe hyaline degeneration, necrosis and muscular lysis. Moderate oedema and abnormal open spaces among the affected muscle cells are also observed, as is the presence of large oval or irregular basophilic cytoplasmic inclusion bodies in infected muscles (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006).

#### 4.3. Cell culture for isolation

MrNV has been isolated in insect cell lines, but is not a recommended method (Sudhakaran *et al.*, 2007b) (Hernandez-Herrera *et al.*, 2007).

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR methods for MrNV and XSV are included in this section for completeness. However, the case definitions in Section 6 are based on detection methods for MrNV only.

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5. *Use of molecular techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

##### *Extraction of nucleic acids*

Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances.

##### 4.4.1. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR assay can be performed using the SYBR Green dye based on the method described by Hernandez-Herrera *et al.* (2007) or the TaqMan assay described by Zhang *et al.* (2006).

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Hernandez-Herrera <i>et al.</i> (2007); GenBank Accession No.: AY222839			
MrNV/RNA1	Fwd: AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG Rev: CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G	500 nM 500 nM	40 cycles of: 95°C/15 sec, 60°C/5 sec and 72°C/10 sec
Method 2: Zhang <i>et al.</i> (2006); GenBank Accession No.: AY231436			
MrNV/RNA1	Fwd: CAA-CTC-GGT-ATG-GAA-CTC-AAG-GT Rev: AGG-AAA-TAC-ACG-AGC-AAG-AAA-AGT-C Probe: FAM-ACC-CTT-CGA-CCC-CAG-CAA-TGG-TG-TAMARA	1000 nM 1000 nM 400 nM	50 cycles of: 94°C/30 sec and 58°C/30 sec
Method 3: Zhang <i>et al.</i> (2006); GenBank Accession No.: DQ174318			
XSV	Fwd: AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA Rev: CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG Probe: FAM-CAT-GCC-CCA-TGA-TCC-TCG-CA-TAMARA	1000 nM 1000 nM 400 nM	50 cycles of: 94°C/30 sec and 58°C/30 sec

#### 4.4.2. Conventional RT-PCR

The protocol for the conventional RT-PCR for detection of *MrNV*/*XSV* developed by Sri Widada *et al.* (2003), Sahul Hameed *et al.* (2004a; 2004b) and Sudhakaran *et al.* (2007a) is recommended. *MrNV* and *XSV* can be detected by conventional RT-PCR separately using a specific set of primers or these two viruses can be detected simultaneously using a single-tube one-step multiplex RT-PCR (Yoganandhan *et al.*, 2005). Conventional Real-time RT-PCR is recommended in situations where high sensitivity is required.

Pathogen / target gene	Primer (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: One step RT-PCR (Sri Widada <i>et al.</i> , 2003; Sahul Hameed <i>et al.</i> , 2004a, b; Sudhakaran <i>et al.</i> , 2007a) GenBank Accession No.: AY222840 ( <i>MrNV</i> ) and AY247793 ( <i>XSV</i> )			
<i>MrNV</i>	Fwd: GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG Rev: AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40sec and 68°C/60 sec
<i>XSV</i>	Fwd: CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA Rev: CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec
Method 2: nested RT-PCR using above-mentioned primers as external primers (Sudhakaran <i>et al.</i> , 2007a)			
<i>MrNV</i>	Internal primers: Fwd: GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT Rev: GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/60 sec, 55°C/60 sec and 72°C/60 sec
<i>XSV</i>	Internal primers: Fwd: ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA Rev: GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/60 sec, 55°C/60 sec and 72°C/60 sec
Method 3: Multiplex RT-PCR (Yoganandhan <i>et al.</i> , 2005) GenBank Accession No.: AY222840 ( <i>MrNV</i> ) and AY247793 ( <i>XSV</i> )			
<i>MrNV</i>	Fwd: GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C Rev: GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec
<i>XSV</i>	Fwd: GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G Rev: CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Haridas *et al.* (2010) have applied loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *MrNV* and *XSV* in the freshwater prawn. A set of four primers, two outer primers and two inner primers, have been designed separately for detection of *MrNV* and *XSV*.

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

The presence of *MrNV* in infected cells can be demonstrated in histological sections using a DIG-labelled DNA *in-situ* hybridisation probe specific for *MrNV* (Sri Widada *et al.*, 2003).

---

#### 4.7. Immunohistochemistry

None developed.

#### 4.8. Bioassay

Not used for diagnostic purposes.

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

##### 4.9.1. ELISA

Antibody-based diagnostic methods for *MrNV* include the ELISA described by Romestand & Bonami (2003) or the triple-antibody sandwich (TAS) ELISA based on a monoclonal antibody (Qian *et al.*, 2006).

##### 4.9.2. Lateral flow assay (LFA)

An antibody-based lateral flow assay (LFA) has been developed for the early detection of *MrNV* in the PL stage (Jamalpure *et al.*, 2021).

#### 4.10. Other methods

None

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time RT-PCR is recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with *MrNV*.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOAHP Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

#### 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

##### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with *MrNV* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR
- ii) Positive result by conventional RT-PCR
- iii) Positive result by LAMP

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *MrNV* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR result and positive conventional RT-PCR and sequence analysis

## 6.2 Clinically affected animals

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *MrNV* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Clinical signs consistent with infection by *MrNV*
- ii) Histopathology consistent with infection by *MrNV*
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Positive conventional RT-PCR
- v) Positive result by *in situ* hybridisation
- vi) Positive result by LAMP
- vii) Positive result by Ag ELISA
- viii) Positive result by lateral flow assay

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *MrNV* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result for real time RT-PCR and positive result by conventional RT-PCR with sequence analysis
- ii) Positive result by ISH followed by positive result by conventional RT-PCR with sequence analysis
- iii) Positive result by ISH followed by positive result by real-time RT-PCR

## 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *MrNV* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with *MrNV*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe ( <i>n</i> )	DSp ( <i>n</i> )	Reference test	Citation
RT-PCR	Diagnosis	Clinically affected PL from hatchery and nursery	Whole post-larvae	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	100 ( <i>n</i> =20)	100 ( <i>n</i> =20)	Western blot or ELISA	Sri Widada <i>et al.</i> (2003); Sahul Hameed <i>et al.</i> (2011)
Lateral flow immun assay	Surveillance	PL from prawn hatcheries	Whole post-larvae	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	100 ( <i>n</i> =80)	90 ( <i>n</i> =80)	RT-PCR	Jamalpure <i>et al.</i> (2021)

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study, RT-PCR: = reverse transcription polymerase chain reaction.

### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,  
RT-PCR: = reverse transcription polymerase chain reaction.

## 7. References

- ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.-R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.
- BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.
- FAROOK M.A., SUNDAR RAJ N., MADAN N., VIMAL S., ABDUL MAJEED S., TAJU G., RAJKUMAR T., SANTHOSHKUMAR S., SIVAKUMAR S. & SAHUL HAMEED A.S. (2014). Immunomodulatory effect of recombinant *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus capsid protein (r-MCP) against white tail disease of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture*, **433**, 395–403.
- HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR B., NAIR C.M. & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.
- HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.
- HO K.L., GABRIELSEN M., BEH P.L., KUEH C.L., THONG Q.X. & STREETLEY J. (2018). Structure of the *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: a new genus within the nodaviridae? *PLOS Biology*, **16**, e3000038.
- HO K.L., KUEH C.L., BEH P.L., TAN W.S. & BHELLA D. (2017). Cryo-Electron microscopy structure of the *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus capsid at 7 angstroms resolution. *Scientific Reports*, **7**, 2083.
- HSIEH C.-Y., WU Z.-B., TUNG M.-C., TU C., LO S.-P., CHANG T.-C., CHANG C.-D., CHEN S.-C., HSIEH Y.-C. & TSAI S.-S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00762.x>
- JAMALPURE S., VIMAL S., NAFEEZ AHMED A., SAHUL HAMEED A.S., PAKNIKAR K.M. & JYTIKA M.R. (2021). On-site detection of nodavirus in post larval (PL) stage of the giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: A test to nip the problem in the bud. *Aquaculture*, **534**, 736292; <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736292>
- MURWANTOKO M., ARIF B., ROOSMANTO R & MASASHI K. (2016). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in a giant freshwater prawn hatchery in Indonesia. *Springer Plus*, **5**, 1729.
- NAVEENKUMAR S., SHEKAR M., KARUNASAGAR I. & KARUNAS I. (2013). Genetic analysis of RNA1 and RNA2 of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) isolated from India. *Virus Res.*, **173**, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.003>
- NAVEEN KUMAR S., PRAVEEN R., INDRANI K. & KARUNASAGAR I. (2021). Recombinant viral proteins delivered orally through inactivated bacterial cells induce protection in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) against White Tail Disease. *J. Fish Dis.*, **44**, 601–612.
- OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.
- QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

- 
- QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W. LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.
- RAVI N. & SAHUL HAMEED A.S. (2016). Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Aquaculture Res.*, **47**, 1231–1237.
- ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.
- SAEDI T. A., HASSAN M., WEN S. T., KHATIJAH Y., HASSAN M.D., KUA B.C., SOON G.T. & SUBHA B. (2012). Detection and phylogenetic profiling of nodavirus associated with white tail disease in Malaysian *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Mol. Biol. Rep.*, **39**, 5785–5790.
- SAHUL HAMEED A.S. & BONAMI J.R. (2012). White Tail Disease of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Indian J. Virol.*, **23**, 134–140.
- SAHUL HAMEED A.S., RAVI M., FAROOK M.A., TAJU G., HERNANDEZ-HERRERA R.I. & BONAMI J.R. (2011). Screening the post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii* for early detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) by RT-PCR and immunological techniques. *Aquaculture*, **317**, 42–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.022>
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and its associated small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.
- SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC I., QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.
- SRI WIDADA J., RICHARD V., SHI Z., QIAN D. & BONAMI J.R. (2004). Dot-Blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 83–87.
- SUDHAKARAN R., HARIBABU P., KUMAR S.R., SARATHI M., AHMED V.P., BABU V.S., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145. doi: 10.3354/dao01886.
- SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **30**, 27–35.
- SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) in C6/36 mosquito cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.
- SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.
- WANG C.S., CHANG J.S., WEN C.M., SHIH H.H., & CHEN S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **31**, 415–422.
- YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAS M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.
- YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 65–69.

---

ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.-R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.

\*  
\* \*

**NB:** There is a WOA Reference Laboratory for infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease) (please consult the WOA web site: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>) any further information on infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

**NB:** FIRST ADOPTED IN 2009. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.9  
INFECTION WITH  
YELLOW HEAD VIRUS GENOTYPE 1

---

1. Scope

Infection with yellow head virus genotype 1 means infection with the pathogenic agent yellow head virus genotype 1 (YHV1) of the Genus *Okavirus* and Family *Roniviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Yellow head virus genotype 1 (YHV1; species *Yellow head virus*) is one of eight known genotypes in the yellow head complex of viruses and is the only known genotype that causes yellow head disease. YHV1 forms enveloped, rod-shaped particles 40–50 nm × 150–180 nm (Chantanachookin *et al.*, 1993; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Envelopes are studded with prominent peplomers projecting approximately 11 nm from the surface. Nucleocapsids appear as rods (diameter 20–30 nm) and possess a helical symmetry with a periodicity of 5–7 nm. Virions comprise three structural proteins (nucleoprotein p20 and envelope glycoproteins gp64 and gp116) and a ~26 kb positive-sense single-stranded RNA genome. The nucleotide sequence of the ORF1b region of the viral genome has been used to determine the phylogenetic relationships of YHV1 and other yellow head virus genotypes (Dong *et al.*, 2017; Mohr *et al.*, 2015; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

YHV1, yellow head virus genotype 2 (YHV2; species *Gill-associated virus*) and yellow head virus genotype 8 (YHV8; species *Okavirus 1*) have been formally classified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (Walker *et al.*, 2021). Four other genotypes in the complex (YHV3–YHV6) occur commonly in healthy *Penaeus monodon* in East Africa, Asia and Australia and are rarely or never associated with disease (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). Of the remaining two yellow head virus genotypes, YHV7 was detected in diseased *P. monodon* in Australia (Mohr *et al.*, 2015) and YHV8 was detected in *P. chinensis* suspected of suffering from acute hepatopancreatic necrosis disease (Liu *et al.*, 2014). There is evidence of genetic recombination between genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

YHV1, identified by either transmission electron microscopy (TEM) (Nunan *et al.*, 1998), or molecular methods (Durand *et al.*, 2000; McColl *et al.*, 2004), has been detected in frozen commodity prawns with infectivity demonstrated by bioassay.

2.1.3. Survival and stability outside the host

YHV1 remains viable in aerated seawater for up to 72 hours (Flegel *et al.*, 1995b).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

---

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with YHV1 according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), dagger blade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*) and whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*).

#### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with YHV1 according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: banana prawn (*Penaeus merguensis*), carpenter prawn (*Palaemon serrifer*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), Pacific blue prawn (*Palaemon styliiferus*), red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*), Sunda river prawn (*Macrobrachium sintangense*) and yellow shrimp (*Metapenaeus brevicornis*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: acorn barnacle (*Chelonibia patula*), blue crab (*Callinectes sapidus*), cyclopoid copepod (*Ergasilus manicatus*), gooseneck barnacle (*Octolasmis muelleri*), Gulf killifish (*Fundulus grandis*) and paste shrimp (*Acetes* sp.).

#### 2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

*Penaeus monodon* are susceptible to YHV1 infection beyond PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995). Lightner *et al.* (1998) YHV1 challenge caused disease in juveniles of *Penaeus aztecus*, *P. duorarum*, *P. setiferus*, and *P. vannamei* but postlarvae appeared resistant (Lightner *et al.* 1998). YHV1 infections are usually detected only when disease is evident, however infections have been detected in healthy wild populations of *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.*, 2008). Natural YHV1 infections have been detected in *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis*, and *P. styliiferus* (Cowley *et al.*, 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b).

#### 2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

YHV1 targets tissues of ectodermal and mesodermal origin including lymphoid organ, haemocytes, haematopoietic tissue, gill lamellae and spongy connective tissue of the subcutis, gut, antennal gland, gonads, nerve tracts and ganglia (Chantanachookin *et al.*, 1993; Lightner, 1996).

#### 2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

YHV1 was detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in clinically normal wild *P. stylirostris* collected for surveillance purposes in the Gulf of California in 2003 (Castro-Longoria *et al.*, 2008). The infectious nature of the YHV1 detected was confirmed by experimental infections. There is also evidence that YHV1 can persist in survivors of experimental infection (Longyant *et al.*, 2005; 2006).

#### 2.2.6. Vectors

There are no known vectors of YHV1.

### 2.3. Disease pattern

#### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

In farmed *P. monodon*, YHV disease can cause up to 100% mortality within 3–5 days of the first appearance of clinical signs (Chantanachookin *et al.*, 1993). Mortalities can be induced by experimental exposure of *P. monodon* to YHV1 (Oanh *et al.*, 2011).

#### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Shrimp from late postlarvae (PL) stages onwards can be infected experimentally with YHV1. In cultured shrimp, infection can result in mass mortality occurring, usually in early to late juvenile stages. Moribund shrimp may exhibit a bleached overall appearance and a yellowish discoloration of the cephalothorax. However, these disease features are not particularly distinctive, and gross signs are not reliable even for preliminary diagnosis of YHV1.

---

Exceptionally high feeding activity followed by an abrupt cessation of feeding may occur within 2–4 days of the appearance of gross clinical signs of disease and mortality. Moribund shrimp may congregate at pond edges near the surface (Chantanachookin *et al.*, 1993).

### 2.3.3 Gross pathology

The yellow hepatopancreas of diseased shrimp may be exceptionally soft when compared with the brown hepatopancreas of a healthy shrimp (Chantanachookin *et al.*, 1993).

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

YHV1 can be transmitted horizontally by ingestion of infected tissue, immersion in membrane-filtered tissue extracts, or by cohabitation with infected shrimp (Walker & Sittidilokratna, 2008). YHV1 replicates in the cytoplasm of infected cells in which long filamentous pre-nucleocapsids are abundant and virions bud into cytoplasmic vesicles in densely packed paracrystalline arrays for egress at the cytoplasmic membrane (Chantanachookin *et al.*, 1993).

### 2.3.5. Environmental factors

Elevated virus infection levels accompanied by disease can be precipitated by physiological stress induced by sudden changes in pH or dissolved oxygen levels, or other environmental factors (Flegel *et al.*, 1997).

### 2.3.6. Geographical distribution

YHV1 has been reported in South-East Asia (Walker *et al.*, 2001). YHV1 has also been detected in *P. stylirostris* and *P. vannamei* in the Americas (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sanchez-Barajas *et al.*, 2009).

See WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

None available.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No effective commercial anti-viral product is yet available.

### 2.4.3. Immunostimulation

A multi-target dsRNA for simultaneous inhibition of YHV1 and white spot syndrome virus demonstrated inhibition of the two viruses when administered to shrimp by injection (Chaimongkon *et al.*, 2020)

### 2.4.4. Breeding resistant strains

Not reported.

### 2.4.5. Inactivation methods

YHV1 can be inactivated by heating at 60°C for 15 minutes (Flegel *et al.*, 1995b). Little information is available on other inactivation methods but the virus appears to be susceptible to treatment with chlorine at 30 parts per million (0.03 mg ml<sup>-1</sup>) (Flegel *et al.*, 1997).

### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not reported.

### 2.4.7. General husbandry

The focus is to exclude YHV1 from entering production systems; for example, by using specific pathogen-free (SPF) stock, batch testing stock and biosecurity measures to reduce entry into culture systems.

---

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

For diagnosis during a disease outbreak, moribund shrimp collected from pond edges are the preferred source of material for examination. Apparently healthy shrimp should also be collected from the same ponds. For surveillance in populations of apparently healthy shrimp, life stages from PL stage 15 onwards can provide tissue sources useful for testing.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

In moribund shrimp suspected to be infected with YHV1, pleopods, gill and lymphoid organ are the most suitable sample tissues. For screening or surveillance of juvenile or adult shrimp that appear grossly normal, pleopods or gills are preferred.

#### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Not determined.

#### 3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph can be used for non-lethal sampling.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

#### 3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

##### 3.5.1. Samples for bioassay

The success of bioassay depends strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

##### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (absolute) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it can be frozen at –20°C or below for 1 month or less; for long-term storage, –80°C is recommended.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

##### 3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B.2.2 of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

##### 3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

---

### 3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, however, larger specimens should be processed and tested individually. Small life stages can be pooled to obtain the minimum amount of material for molecular detection.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

**Ratings for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

WOAH Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

**Table 4.1.** WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology						++	++	1				
Cell culture												
Real-time RT-PCR												
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						++	++	1				
Bioassay					+	+	+	1				
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods <sup>3</sup>												
Other methods <sup>3</sup>												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification;

Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

---

#### 4.1. Wet mounts

Not applicable.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

Fix the cephalothorax tissues of moribund shrimp suspected to be affected by YHV1 in Davidson's fixative, prepare tissue sections and stain with Meyer's haematoxylin and eosin (H&E) using standard histological procedures (Lightner, 1996). Examine tissues of ectodermal and mesodermal origin by light microscopy for the presence of moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions approximately 2 µm in diameter or smaller (Chantanachookin *et al.*, 1993). Tissues of the lymphoid organ, stomach subcuticulum and gills are particularly informative.

Lymphoid organ spheroids are commonly observed in healthy *P. monodon* chronically infected with YHV1 or GAV and lymphoid organ necrosis often accompanies disease (Spann *et al.*, 1997). However, spheroid formation and structural degeneration of lymphoid organ tissue also result from infection by other shrimp viruses (Lightner, 1996).

#### 4.3. Cell culture for isolation

Although primary shrimp cell culture methods are available, they are not recommended to isolate and identify YHV1 as a routine diagnostic method. No continuous cell lines suitable for YHV1 culture are available.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

##### *Extraction of nucleic acids*

Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances.

##### 4.4.1. Real-time PCR

Not available.

##### 4.4.2. Conventional RT-PCR

Three RT-PCR protocols are described. For all conventional RT-PCR protocols, assignment to YHV genotype 1 can be achieved by nucleotide sequence analysis of the RT-PCR amplicon. Reference sequences for YHV1 include:

Protocol 1 is a 1-step RT-PCR that can be used to detect YHV1 in affected shrimp. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Wongteerasupaya *et al.* (1997). This protocol will detect YHV1 but not GAV or any of the other genotypes currently recognised.

Protocol 2 is a more sensitive multiplex nested RT-PCR that can be used to differentiate YHV1 from GAV. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Cowley *et al.* (2004). The first stage of the multiplex nested RT-PCR (primary RT-PCR) was designed to detect YHV1 and GAV but has been reported to also detect YHV7 (Mohr *et al.*, 2015). Both the primary RT-PCR and the nested PCR detected the novel YHV genotype from China (People's Rep. of) (Liu *et al.*, 2014). In the second PCR step, a 277 bp product indicates detection of YHV and a 406 bp product indicates detection of GAV. The presence of both 406 bp and 277 bp products indicates a dual infection with GAV and YHV1. The nested PCR can be run as two separate assays specific for YHV1 or GAV by omitting either the G6 or Y3 primer, respectively. **NOTE:** Due to reported problems with primer specificity for some emerging strains, all PCR products generated using protocol 2 should be sequenced to confirm the virus genotype.

Protocol 3 is a multiplex nested RT-PCR protocol that can be used for screening shrimp for any of the seven genotypes of the yellow head complex of viruses. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Wijegoonawardane *et al.* (2008b). Two primers were designed to each site, one accommodating sequence variations

amongst YHV1 isolates and the other variations amongst isolates of the other genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2008b). It is not known whether this assay will detect the YHV genotype recently detected in China (People's Rep. of) (Liu *et al.*, 2014).

**Primer sequences**

Pathogen / target gene	Primer (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Protocol 1 (Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1997; GenBank Accession No.: ??; amplicon size: 135 bp)			
YHV1 / ORF1b	10F: CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG 144R: AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT	180 nM 180 nM	40 cycles of 94°C for 30sec, 58°C for 45 sec, 68°C for 45 sec,
Protocol 2 (Cowley <i>et al.</i> , 2004; GenBank Accession No.: ??)			
YHV1 and GAV / ORF1b	<p>Primary (Amplicon size: 794 bp)</p> <p>GY1: 5GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG GY4: GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG</p> <p>Nested for detection of YHV1 (Amplicon size: 277 bp)</p> <p>GY2: CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA Y3: ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT</p> <p>Nested for detection of GAV (Amplicon size: 406 bp)</p> <p>GY2: CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA G6: GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT</p>	180 nM 180 nM  360 nM 360 nM  360 nM 360 nM	35 cycles of 95°C for 30 sec, 66°C for 30 sec, and 68 C for 45 sec
Protocol 3 (Wijegoonawardane <i>et al.</i> , 2008b; GenBank Accession No.: ??)			
YHV1 to YHV7 / ORF1b	<p>Primary (amplicon size: 359 bp)</p> <p>YC-F1ab pool: ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC</p> <p>YC-R1ab pool: TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC</p> <p>Nested (amplicon size: 147 bp)</p> <p>YC-F2ab pool: CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA</p> <p>YC-R2ab pool: RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT</p> <p>Mixed base codes: R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT), H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).</p>	180 nM 180 nM  180 nM 180 nM  180 nM 180 nM  180 nM 180 nM	35 cycles of 94°C for 45 sec, 60°C for 45 sec, 68°C for 45 sec,   35 cycles of 94°C for 45 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 45 sec;

The primer contains a mismatch for GAV but is specific for YHV1. The mismatch can cause false-positives with GAV in the nested PCR of protocol 2 where GAV generates an amplicon of very similar size to the expected size of the YHV1 amplicon. For GAV, the 7th base from left (T) is substituted for C so that the primer sequence for GAV should be 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', according to the sequence data of the GAV genome (database accession numbers: NC\_010306.1 and AF227196.2).

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

---

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Not available.

#### 4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

The protocol of Tang *et al.* (2002) is suitable for detecting YHV1 or GAV (Tang & Lightner, 1999). To preserve viral RNA accessibility, fix tissues sampled from live shrimp in neutral-buffered, modified Davidson's fixative without acetic acid (RF-fixative) (Hasson *et al.*, 1997). To achieve good tissue preservation whilst also preserving RNA accessibility, normal Davidson's fixative can be used as long as the fixation time is limited to 24 hours (maximum of 48 hours). Detailed methods can be found in Tang *et al.* (2002) YHV-infected cells give a blue to purple-black colour against the brown counter stain. Positive controls of YHV-infected tissue and negative controls of uninfected shrimp tissue should be included. The digoxigenin-labelled DNA probe can be prepared by PCR labelling using the following primers:

YHV1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'

YHV1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

#### 4.7. Immunohistochemistry

Not applicable.

#### 4.8. Bioassay

The bioassay procedure is based on that described by Spann *et al.* (1997), but similar procedures have been described by several other authors (e.g. Lu *et al.*, 1994). The bioassay should be conducted in susceptible shrimp that have been determined to be free from YHV complex viruses.

Suspect YHV1-infected samples should be maintained at 4°C or on ice. If necessary, the whole shrimp or the retained cephalothorax may be snap-frozen and stored at -80°C or in liquid nitrogen until required. Viral inoculum should be prepared as described by Spann *et al.* (1997).

Juvenile shrimp of a known susceptible species are injected with viral inoculum. Negative controls (buffer injected) and positive controls (known YHV1 positive material) treatment groups are required. Shrimp should be maintained separately to prevent cross-contamination between treatments. Observe the shrimp and record mortalities for at least 21 days or until the test and positive control groups reach 100% mortality.

#### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods (ELISA, etc.)

None has been successfully developed.

#### 4.10. Other methods

None at present.

### 5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Nested RT-PCR (Protocol 3) is recommended for demonstrating freedom from YHV1 in an apparently healthy populations. Sequencing of any amplified PCR products is required to determine the YHV genotype. Two-step PCR negative results are required for YHV1.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

---

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>1</sup>

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with YHV1 shall be suspected if the following criterion is met:

- i) Positive result by a recommended RT-PCR detection test

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with YHV1 is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) A positive result by conventional RT-PCR and identification of YHV1 by sequence analysis of the amplicon

## 6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with YHV1 shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs consistent with YHV1 infection
- ii) Histopathology consistent with YHV1 infection
- iii) Positive result by conventional RT-PCR
- iv) Positive result by ISH
- v) Positive result by bioassay

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with YHV1 is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) A positive result from each of two RT-PCR methods targeting non-overlapping parts of the genome followed by sequence analysis of the amplicons to identify YHV1

## 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with YHV1 are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with YHV1, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary

---

<sup>1</sup> For example transboundary commodities.

under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

### 6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,  
PCR: = polymerase chain reaction.

### 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,  
PCR: = polymerase chain reaction.

## 7. References

CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31**, 953–956.

CHAIMONGKON D., ASSAVALAPSAKUL W., PANYIM S. & ATTASART P. (2020). A multi-target dsRNA for simultaneous inhibition of yellow head virus and white spot syndrome virus in shrimp. *J. Biotechnol.*, **321**, 48–56. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.06.022. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32615142.

CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATTAYA K., SRIURAITANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Multiplex RT-nested PCR differentiation of gill-associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.018.

COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.

DONG X., LIU S., ZHU L., WAN X., LIU Q., QIU L., ZOU P., ZHANG Q. & HUANG J. (2017) Complete genome sequence of an isolate of a novel genotype of yellow head virus from *Fenneropenaeus chinensis* indigenous in China. *Arch Virol* **162**, 1149-1152.

DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquatic Anim. Health*, **12**, 128–135.

FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAITANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. *In: Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 65–79.

FLEGEL T.W., SRIURAITANA S., WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. *In: Swimming Through Troubled Water*, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.

- 
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV). In: Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.
- LIGHTNER D.V. (Ed.) (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- LIGHTNER D.V., HASSON K. W., WHITE B. L & REMAN R. M. (1998) Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus *J. Aquatic Anim. Health*, **10**, 271-281
- LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., WANG H.-L., WANG Q.-T., LIU F. & ZHANG Q.-L. (2014) Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703–709.
- LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.
- LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.
- LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.
- MCCOLL K.A., SLATER J., JEYASEKARAN G., HYATT A.D. & CRANE M.St.J. (2004). Detection of white spot syndrome virus and yellowhead virus in prawns imported into Australia. *Aust. Vet. J.*, **82**, 69–74.
- MOHR P.G., MOODY N.J.G, HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.St.J. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.
- MOODY N. ET AL (IN PREPARATION). Development of a real-time and conventional PCR assays for the detection of yellow head virus genotype 1.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.
- SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*, **17**, 101–112.
- SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.
- TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.
- WALKER P.J., COWLEY J.A. SPANN K.M., HODGSON R.A.J. HALL M.R & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 292–302.
-

---

Walker P.J. & Sittidilokratna N. (2008). Yellow Head Virus. *In: Encyclopedia of Virology*, third edition. Academic Press, 476–483.  
<https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00779-2>

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., SITTIDILOKRATNA, N., PHETCHAMPAL, N., COWLEY, J.A., GUDKOV, N. & WALKER P.J. (2009). Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon shrimp*. *Virology* doi: 10.1016/j.virol.2009.04.015.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., PHAN T., HODGSON R.A.J., NIELSEN L., KIATPATHOMCHAI W. & WALKER P.J. (2008a). Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology* **380**, 213–225.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2008b). Consensus RT-nested PCR to detect yellow head virus genotypes in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **153**, 168–175.

WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 181–186.

WONGTEERASUPAYA C., SRIURAIRATANA S., VICKERS J.E., AKRAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.*, **22**, 45–50.

\*  
\* \*

**NB:** There is a WOA Reference Laboratory for infection with yellow head virus genotype 1  
(please consult the WOA web site:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on  
infection with yellow head virus genotype 1

**NB:** FIRST ADOPTED IN 1995 AS YELLOWHEAD DISEASE. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2019.

CHAPTER 2.4.5.

INFECTION WITH *PERKINSUS MARINUS*

---

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

~~Eastern oyster, *Crassostrea virginica*; Pacific oyster, *C. gigas*; suminoe oyster, *C. ariakensis*; mangrove oyster, *C. rhizophorae*; Cortez oyster, *C. corteziensis* (Andrews 1996; Calvo *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2004; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008); softshell clam, *Mya arenaria*; Baltic macoma, *Macoma balthica* (Dungan *et al.*, 2007).~~

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Perkinsus marinus* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: American cupped oyster (*Crassostrea virginica*), Ariake cupped oyster (*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis*), Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*) and palmate oyster (*Saccostrea palmula*).

2.2.2. ~~Susceptible stages of the host~~ Species with incomplete evidence for susceptibility

~~All stages after settlement are susceptible.~~

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *P. marinus* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: Gasar cupped oyster (*Crassostrea tulipa*), mangrove cupped oyster (*Crassostrea rhizophorae*), and Pacific cupped oyster (*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *gigas*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Columbia black oyster (*Crassostrea columbiensis*), soft shell clam (*Mya arenaria*), and stone oyster (*Striostrea prismatica*).

[...]

---

## Registro de kits de diagnóstico certificados por la OMSA Resumen de los estudios de validación

**Nombre del kit de diagnóstico:** *Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit*

**Nombre del fabricante:** Inncreate Bioscience Co., Ltd.

**Procedimiento /Número de registro:** 082132

**Fecha de registro:** mayo de 2023

**Enfermedad:** Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas en camarones

**Agente patógeno:** Whispovirus, virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV)

**Método utilizado:** Prueba de inmunocromatografía de flujo lateral (IFL)

### Finalidad de la prueba

El kit de diagnóstico *Bioscience Inncreate WSSV RP Rapid Test Kit* (test rápido del WSSV) es un kit de detección cualitativo para la infección por WSSV en los camarones. El dispositivo de inmunocromatografía o inmunoensayo de flujo lateral (IFL) está diseñado para los siguientes propósitos:

1. Diagnóstico confirmatorio efectuado en el terreno de los casos clínicos (incluida la confirmación de los casos sospechosos y una prueba de detección positiva).
2. Estimación de la prevalencia de la infección con el fin de facilitar el análisis de riesgo en los sistemas de producción de camarones para brindar asistencia en las prácticas de gestión. (Este kit no debe utilizarse para estimar la prevalencia en camarones en reproductores o estados post-larvarios antes del traslado a otras granjas acuícolas o a través de las fronteras).
3. Utilización junto con otras pruebas o procedimientos de diagnóstico como ayuda al diagnóstico u otras evaluaciones clínicas o epidemiológicas.

**Especies y muestras:** 2-3 trozos pequeños de branquias de camarón.

#### 1. Información sobre el kit

Consulte el prospecto del kit disponible en la página web de la OMSA “Registro de kits de diagnóstico” o contacte con el fabricante:

Sitio web: <https://www.inncreatebio.com/>

E-mail: [info@inncreatebio.com](mailto:info@inncreatebio.com)

#### 2. Resumen de los estudios de validación

##### Especificidad analítica

##### Conclusión:

Se analizaron camarones infectados por *Vibrio parahaemolyticus*, agente causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), infección por *Enterocytozoon hepatopenaei*, infección por *Monodon Baculovirus*, infección por el virus de la cabeza amarilla e infección por el virus del síndrome de Taura. Todas las muestras infectadas arrojaron resultados negativos.

##### Sensibilidad analítica

##### Conclusión:

Se utilizó una dilución en serie de la proteína diana recombinante del WSSV con tejidos de camarón homogeneizados para estimar el límite de detección (LOD), estimado a 0,4 ng/prueba.

## Repetibilidad

### Conclusión:

La repetibilidad en una misma serie se evaluó utilizando cuadruplicados de seis muestras con diversos niveles de infección, que fueron analizadas por el mismo operador en cinco días distintos. La repetibilidad entre series se realizó analizando las seis muestras a cargo de tres operarios diferentes utilizando tres lotes diferentes de kits durante cinco días. Fue posible reproducir los resultados de las pruebas inter laboratorios y entre laboratorios, con valor kappa de 1,0.

## Características del diagnóstico

Determinación del umbral y estimaciones de la sensibilidad diagnóstica (DSe) y la especificidad diagnóstica (DSp).

### Determinación del umbral:

El kit de diagnóstico *Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit* es una prueba de inmunocromatografía diseñado para lograr una detección cualitativa de la infección por WSSV en los camarones. La banda rosa púrpura debe aparecer tanto en la línea de prueba (T) como en la línea de control (C) para indicar que el camarón fue infectado por WSSV. Si la banda rosa púrpura sólo aparece en la línea de control (C), esto indica que no existe ninguna infección por WSSV o que se observa una ligera infección más allá de la sensibilidad del kit. El umbral está determinado por una sensibilidad analítica de 0,4 ng de la proteína diana.

### Estimaciones de sensibilidad (DSe) y especificidad diagnósticas (DSp)

#### 1. Estimaciones de sensibilidad y especificidad diagnósticas - con animales de referencia definidos

Doscientos cincuenta y dos camarones libres de patógenos específicos se utilizaron como controles negativos (n=105) o test de desafío o *challenge test* (n= 147) con una inyección de 100 ul de hemolinfa infectada por WSSV para determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas en muestras de animales de referencia definidos. De las 147 muestras “de desafío” y positivas a la PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA (Durand & Lightner, 2002), 125 resultaron positivas al kit de prueba rápida del WSSV, mientras que 22 muestras se consideraron falsos negativos. El nivel de infección de estas 22 muestras se consideró muy leve (Ct>32,5). No se observaron resultados falsos positivos en las 105 muestras negativas “sin desafío” a la prueba PCR en tiempo real con la sonda TaqMan de la OMSA.

#### Animal de referencia:

<i>Bioscience Innocreate WSSV RP Rapid Test Kit</i>		Muestra diana: branquia	
		PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA	
		Ct<32,5 considerado positivo	Ct<40 considerado positivo
Sensibilidad del diagnóstico	N	(126)	(147)
	DSe	(99,21 %)	(85,03 %)
	CI	(99,66 % - 99,98 %)	(78,22 % - 90,38 %)
Especificidad del diagnóstico	N	(105)	(105)
	DSp	(100 %)	(100 %)
	CI	(96,55-100 %)	(96,55-100 %)

#### 2. Estimaciones de sensibilidad y especificidad diagnósticas – Camarones de producción

Se analizó un total de 465 camarones provenientes de cuatro lotes provenientes de sistemas de producción; 45 de 465 camarones se clasificaron como sintomáticos y 64 de 465 se clasificaron como positivos (Ct<40), según la prueba qPCR en tiempo real con la sonda TaqMan de la OMSA (Durand & Lightner, 2002).

En comparación con la prueba PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA, la DSe global de la prueba rápida del WSSV fue del 92,50 % cuando Ct<32,50 se considera positivo, del 84,00 % cuando Ct<36 se considera positivo, o del 65,62 % si Ct<40 se considera positivo; la DSp fue del 100 %.

En cuanto al rendimiento diagnóstico en los camarones sintomáticos del sistema de producción, la DSe fue del 93,33 % y la DSp fue del 100 % cuando se utilizó Ct<40 como punto de corte. El valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) fueron del 100 % y el 99,3 % respectivamente. Para las muestras con Ct<32,5 (infección moderada a alta, >≈100 copias), la DSe fue del 92,50 %. En general, el *kit Innocreate Bioscience WSSV Rapid test* muestra una alta concordancia en el diagnóstico.

#### Camarones de producción:

<i>Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit</i>		Especie/muestra diana: branquia			
		Método de la OMSA, PCR en tiempo real con sondas			
		Sintomático	Ct<32,5 considerado positivo	Ct<36 considerado positivo	Ct<40 considerado positivo
<b>Sensibilidad del diagnóstico</b>	N	(45)	(40)	(50)	(64)
	DSe	(93,33 %)	(92,50 %)	(84,00 %)	(65,62 %)
	CI	(95,66 %-99,98 %)	(79,61 %-98,43 %)	(95,66 %-99,98 %)	(52,70 %-77,05 %)
<b>Especificidad del diagnóstico</b>	N	(420)	(425)	(415)	(401)
	DSp	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)
	CI	(99,13 %-100 %)	(99,14 %-100 %)	(70,89 %-92,83 %)	(99,08 %-100 %)

#### Conclusión:

El kit de prueba rápida del WSSV es adecuado para las finalidades definidas y demuestra una alta sensibilidad general en la identificación de niveles moderados y elevados de infección por el WSSV o cuando se utiliza en muestras de camarones sintomáticos; la prueba tiene una especificidad muy alta. Los altos niveles del VPP y del VPN de la prueba y el rápido tiempo de respuesta (15-30 minutos *in situ* frente a >4 horas más el tiempo de envío) lo convierten en una poderosa herramienta para identificar posibles brotes.

Recomendamos a los usuarios que apliquen la prueba a los camarones que presenten cambios de comportamiento (letargo, disminución o ausencia de consumo de alimentos y comportamientos de natación anormales, como natación lenta o de lado, cerca de la superficie del agua o agrupamiento alrededor de los bordes de las unidades de cría), ya sea de forma regular o cuando se produzca estrés ambiental, como cambios rápidos de salinidad, o cuando se sospeche un brote de WSSV.

#### Reproductibilidad

##### Reproductibilidad analítica

#### Conclusión:

La evaluación de la reproductibilidad analítica fue llevada a cabo por dos laboratorios. Se seleccionaron seis muestras con diversos niveles de infección (2 leves, 2 moderados, 1 grave y 1 negativo), determinados por el método de PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA (Durand & Lightner, 2002); se enviaron "muestras ciegas" a los dos laboratorios. Las pruebas se repitieron cuatro veces y se calculó un valor Kappa sobre los resultados de los 24 ensayos repetidos. No se observó ningún error de clasificación en los ensayos (20 positivos y 4 negativos). La concordancia de los dos métodos fue del 100 %, y Kappa =1,0.

#### Reproductibilidad del diagnóstico

---

La reproducibilidad diagnóstica fue realizada por cinco laboratorios en Taiwán y Tailandia, incluido un laboratorio de referencia de la OMSA. El panel de pruebas constaba de 25 muestras (con diversos niveles de infección por el virus, que incluía 5 muestras "conocidas" (3 positivas con concentraciones de proteína diana de 1,6, 0,8 ó 0,4 ng y 2 negativas) y 20 "muestras ciegas" desconocidas. Los laboratorios participantes siguieron los procedimientos descritos en el manual de instrucciones del kit de prueba rápida del WSSV.

### **Conclusión:**

Las muestras fueron analizadas por cada uno de los cinco laboratorios que utilizaron el *Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit*. Los resultados muestran una alta reproducibilidad. Los cinco laboratorios mostraron una concordancia del 100 % en las cinco muestras conocidas. Cuatro de los cinco laboratorios mostraron una concordancia del 100 % en todas las "muestras ciegas", mientras que los resultados de un laboratorio mostraron una ligera discrepancia en una muestra. Con el objetivo de analizar los resultados experimentales de los cinco laboratorios se realizó la prueba Chi-cuadrado de homogeneidad. Prueba Chi-cuadrado independiente p-valor = 0,998 (Hsu *et al.*, 2022).

### **Referencias**

Durand, S., & Lightner, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25(7), 381-389.

Hsu, J. C.-K., Hsu, T.-K., Kannan, J., Wang, H.-C., Tassanakajon, A., & Chen, L.-L. (2022). Diagnostic performance of a Rapid Test Kit for white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 558, 738379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738379>